

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**EAP. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Comparación de cuatro medios de enriquecimiento  
para el aislamiento de salmonella en verduras  
irrigadas con aguas residuales**

**TRABAJO DE APTITUD PROFESIONAL**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Teresa Celina Gallardo Jugo

**ASESOR**

Victoria Yrei Yamakawa

Lima - Perú

1994

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**CLEIBA**



**COMPARACION DE CUATRO MEDIOS  
DE ENRIQUECIMIENTO PARA EL  
AISLAMIENTO DE SALMONELLA  
EN VERDURAS IRRIGADAS CON  
AGUAS RESIDUALES**

**Trabajo de Aptitud Profesional  
para optar el Título de:**

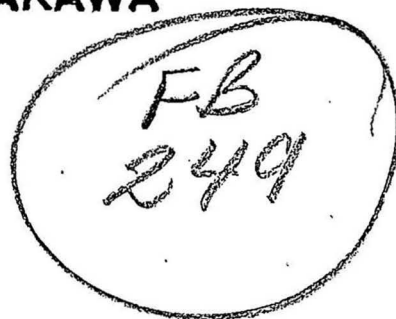
**QUIMICO FARMACEUTICO**

**TERESA CELINA GALLARDO JUGO**

**ASESOR: DRA, VICTORIA YREI YAMAKAWA**

**Lima - Perú**

**1994**





Mi especial agradecimiento a los  
miembros del Jurado Calificador por sus  
orientaciones y sugerencias.

PRESIDENTE:

Dr. JOSE IREY NAMIJIRA

MIEMBROS:

Dra. MARIA ALINA RATTO S.

Dra. VICTORIA YREI Y.

Dra. DORA ORTIZ M.

Mi profundo agradecimiento a  
la Dra. VICTORIA YREI YAMAKAWA,  
por brindarme su sincera amistad  
y su valiosa dirección técnica en  
el logro del presente trabajo.

A la Dra. MARIA ALINA RATTO, mi  
gratitud y reconocimiento por  
su apoyo, colaboración y  
orientación.

A la Dra. DORA ORTIZ M., por  
su apoyo y colaboración.

A mi Alma Matter,  
porque en ella me  
realicé como persona  
y como profesional.

A la Facultad de Farmacia y  
Bioquímica y a todos mis  
profesores y maestros.

Al CLEIBA, por las facilidades y  
colaboración para la realización del  
presente trabajo.

A Dios

por la vida.

A mis Padres: Dago y Lolita,  
por su invalorable esfuerzo en  
mi formación profesional y por  
enseñarme con su vivificante  
ejemplo el amor al trabajo y  
a la vida.

"Que mi realización profesional,  
sólo sea un pequeño reflejo,  
producto de sus dedicaciones y  
sacrificios para con sus hijos".

A mis hermanos:

Lucy, Betty, Challe, Dago,  
Chami, Coco, Adelita, Lenin  
y Mary, por su paciencia,  
estímulo, cariño y apoyo  
invalorables.

A mi pequeño Alejandrino, que  
al llegar al mundo colmó de  
alegría mi vida y me dió  
fuerzas para seguir adelante.

A mi esposo Samuel, compañero y  
amigo quien con su confianza,  
ayuda y estímulo constante hizo  
posible la culminación de este  
trabajo.

A mis sobrinos,  
dedico este esfuerzo con  
cariño, para que la honradez,  
el trabajo y el respeto humano  
sean siempre una guía en sus  
vidas.

A mi Tía Cotty, por haberme  
brindado su cariño y consejos  
en los momentos importantes de  
mi vida.

A Pili, Toshi, Lucha y Silvia,  
por los momentos vividos y los  
anhelos e ideales compartidos.

## S U M A R I O

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	7
1.0.0. GENERALIDADES	
1.1.0 Microbiología de frutas y verduras	8
1.2.0 Microbiología del suelo	21
1.3.0 Consideraciones generales sobre el género <i>Salmonella</i>	26
1.3.1 Caracteres morfológicos y culturales	28
1.3.2 Características Bioquímicas	29
1.3.3 Clasificación del género <i>Salmonella</i>	32
1.3.4 Factores que influyen en la multiplicación de <i>Salmonella</i>	37
1.4.0 Métodos de aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	48
1.4.1 Medios de cultivo para la identificación de <i>Salmonella</i>	52
2.0.0. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1.0 Materiales	70
2.1.1. Equipos	70
2.1.2. Material de vidrio	70
2.1.3. Material de cultivo	72
2.2.0 Metodología Analítica	75
3.0.0. RESULTADOS	105
4.0.0. DISCUSION	108

5.0.0. CONCLUSIONES	111
6.0.0. RECOMENDACIONES	113
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	115
APENDICE	



## R E S U M E N

De los medios de enriquecimiento selectivos para el aislamiento de *Salmonella* que existen en la actualidad, en el presente trabajo se ha comparado la efectividad de cuatro medios de enriquecimiento selectivos, así como la influencia de dos temperaturas de incubación (37°C y 43°C) para la recuperación de *Salmonella* de muestras de verduras irrigadas con aguas residuales de las zonas de cultivo de Callao, San Martín de Porres, San Juan de Miraflores, Cieneguilla y Mercados.

Aplicando la Técnica recomendada por el International Commission on Microbiological Specifications for Foods, (ICMSF) 1983, se ha evaluado la recuperación de *Salmonella*, analizándose un total de 94 muestras de verduras, de las cuales 58 fueron verduras a flor de tierra (VFT), 24 muestras de verduras bajo tierra (VBT) y 12 muestras de verduras de tallo alto (VTA), teniendo como objetivos específicos:

a) Determinar el medio de enriquecimiento que ofreciera la mejor recuperación de *Salmonella* procedente de muestras de verduras.

b) Determinar la temperatura de incubación 37°C y 43°C más efectiva para los medios de enriquecimiento selectivo.

c) Determinar el grado de contaminación de las verduras irrigadas con aguas residuales de las diferentes zonas en estudio.

Las muestras de verduras fueron provenientes de diferentes zonas de cultivo de la ciudad de Lima, en donde se utilizan aguas residuales para el regadío.

Se emplearon cuatro medios de enriquecimiento selectivo: Caldo Selenito-cistina (CS), Caldo Tetraciónato según Muller-Kauffman (CT), Caldo Rappaport (CR) y Caldo Rappaport-Vassiliadis (CRV), incubados a 37°C y 43°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que el caldo Rappaport (CR) es el que mejor recupera serotipos de *Salmonella* (17.0%) frente a Caldo Rappaport-Vassiliadis (10.63%), Caldo Tetraciónato (4.25%) y Caldo Selenito-cistina (0.0%) para las muestras de verduras. Asimismo, se ha comprobado que la temperatura de 43°C ofrece mejor recuperación de serotipos de *Salmonella* (30.85%) que la de 37°C (1.06%).

## I N T R O D U C C I O N

El término aguas residuales puede definirse en un sentido amplio, como la combinación de líquidos residuales provenientes de poblaciones humanas, con la posible mezcla de aguas superficiales y subterráneas.

El uso de aguas residuales para la irrigación y fertilización de campos de cultivo es practicado en varias partes del mundo por lo menos desde hace 400 años sin embargo, dada la naturaleza de estas aguas siempre ha sido motivo de preocupación para los investigadores la presencia de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas en ellas (18).

Las verduras irrigadas con aguas residuales constituyen un factor importante en la transmisión de agentes patógenos al medio y por lo tanto, elemento de riesgo para la salud humana o animal (11).

Entre los microorganismos más comunes e importantes que pueden hallarse en las aguas superficiales y residuales encontramos a las especies del género *Salmonella*, que son patógenas para el hombre y la

enfermedad más común que ellas producen es la salmonelosis, que es una gastroenteritis aguda, con dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas y vómitos (39).

La *Salmonella* procede, normalmente de alimentos de origen animal, aunque puede ser vehiculizada por productos vegetales y agua (45).

Hasta el momento no se ha podido desarrollar algún método que pueda garantizar la recuperación de todos los serotipos de *Salmonella*, provenientes de diferentes tipos de muestras de alimentos, las cuales poseen parámetros muy particulares y sometidos a variadas condiciones de preparación y conservación.

Un paso muy importante en la detección de *Salmonella* es el enriquecimiento selectivo que sirve para favorecer el crecimiento de *Salmonella* e inhibir a la flora acompañante de las muestras de alimentos.

Hace muchos años que las principales instituciones American Public Health Association (APHA), International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), International Organization for Standardization (ISO), Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT) encargadas de reglamentar las técnicas que deben emplearse para la investigación de *Salmonella* en diferentes productos, recomiendan el empleo del Caldo Selenito y Caldo Tetratiónato como medios de

enriquecimiento selectivo para dicha bacteria; investigaciones recientes están demostrando que con el empleo de otros medios de cultivo se logra una mejor recuperación de *Salmonella*.

RAPPAPORT y col (1956) usaron una combinación de 4% (P/V) de cloruro de magnesio y 0.012% (P/V) de verde de malaquita y resultó el medio de enriquecimiento para *Salmonella* (24,63).

VASSILIADIS, TRICHOPOULOS, PAPADAKIS y POLITI (1970) modificaron el medio y fue posteriormente llamado el medio R25.

En 1976 fueron introducidas dos grandes modificaciones en la composición y el uso de los medios de enriquecimiento para *Salmonella* que es el medio Rappaport cloruro de magnesio verde de malaquita. Una modificación consiste en la reducción en un tercio de la cantidad de verde de malaquita contenido en la fórmula original del medio Rappaport y la otra consiste en la incubación a 43°C en vez de 37°C. El nuevo medio fue primero llamado R10 medio y posteriormente se le llamó medio de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis o medio RV (62,63).

Desde 1977 se han venido realizando estudios comparativos para estandarizar la técnica. Las variaciones introducidas por diferentes investigadores son en cuanto al volumen de medio de cultivo, tamaño del

inóculo, incorporación de antibióticos (Novobiocina) al medio de cultivo y temperatura de incubación.

En la actualidad el medio Rappaport-Vassiliadis (RV) ha sido aceptado por la ISO después de haber comprobado que es un medio con una alta recuperabilidad, fácil de preparar en el laboratorio y económico. También se puede conseguir en el comercio bajo la forma deshidratada.

"Comparación de Cuatro Medios de Enriquecimiento para aislamiento de *Salmonella* en Verduras irrigadas con Aguas Residuales" forma parte de una serie de trabajos derivados del proyecto de investigación denominado "Evaluación Microbiológica y Toxicológica del reuso de aguas residuales" realizado por el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS) y el Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación de Bacteriología Alimentaria (CLEIBA) por Convenio con el International Development Research Center (IDRC) del Canadá.

## O B J E T I V O S

### OBJETIVO GENERAL.-

Comparar la efectividad de cuatro medios de enriquecimiento selectivos, así como la influencia de dos temperaturas 37°C y 43°C para la recuperación de *Salmonella* de muestras de verduras irrigadas con aguas residuales de las zonas de cultivo de Callao, San Martín de Porres, San Juan de Miraflores, Cieneguilla y Mercados.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

a) Determinar el medio de enriquecimiento con mayor porcentaje de recuperación de *Salmonella* en las muestras de verduras.

b) Determinar la temperatura de incubación más efectiva para los medios de enriquecimiento selectivo.

c) Determinar el grado de contaminación de las verduras irrigadas con aguas residuales de las diferentes zonas en estudio.

## 1.- G E N E R A L I D A D E S

### 1.1 MICROBIOLOGIA DE FRUTAS Y VERDURAS

Es relativamente poco lo que se conoce sobre la microbiología de frutas y verduras, lo que contrasta con la gran cantidad de trabajos realizados sobre microbiología de los alimentos de origen animal como leche, huevos, carne, productos cárnicos, pescados y productos derivados de la pesca. Ello se debe a que los microorganismos nocivos para la salud humana, como las especies patógenas del hombre y animales, son muchísimo más raros en las frutas y verduras que en los alimentos de origen animal (19). El interés fisiológico de las verduras en la alimentación reside ante todo en su contenido en vitaminas como caroteno, complejo B y C y sales minerales, mientras que su valor nutritivo es pequeño, debido a que en comparación con otros alimentos tienen un menor contenido en hidratos de carbono, grasas y proteínas.

Su contenido en celulosa es de gran importancia para la regulación del peristaltismo intestinal (19).

Estos productos alimenticios pueden sufrir deterioro por causas bióticas, incluso antes de su recolección, pero las más importantes tienen lugar por contaminaciones durante el transporte, almacenamiento y venta.



A medida que pasa el tiempo, después de ser recolectadas los tejidos pierden resistencia, facilitando el paso de los gérmenes que llegan hasta ellos (50).

Las bacterias, virus, quistes de protozoos, huevos de helmintos, hongos y levaduras presentes en las aguas de alcantarilla y residuales utilizadas para regar los cultivos, se adhieren a la superficie de las verduras y frutas, con lo que quedan protegidas de la influencia del nuevo ambiente (generalmente no se eliminan cuando se someten a un lavado rutinario con agua potable).

Todos los vegetales poseen en la superficie una microflora, más o menos típica, que es arrastrada a los lugares en que puede multiplicarse a través del suelo, aire, agua y animales.

Los vegetales carecen de microorganismos en la profundidad de sus tejidos; sin embargo, existen ciertas excepciones como los nódulos de las raíces de leguminosas, plantas superiores que poseen bacterias (*Rhizobium*) que viven en simbiosis con ellas. Se conocen además numerosas bacterias, hongos y virus fitopatógenos que penetrando en los tejidos de las plantas sanas los dañan o destruyen (19).

Las raíces, las hojas de crecimiento bajo y los tallos se contaminan gravemente por el uso de aguas residuales, o agua de irrigación contaminada artificialmente (18,29).

La mayor o menor fijación depende de muchos factores: tipo de germen, temperatura, intensidad de luz, materia orgánica, asociaciones bacterianas, aw, humedad, pH, composición del alimento contaminado (50).

El pH, relativamente bajo, frena la multiplicación de muchas bacterias, pero no la de los hongos, que son los más importantes agentes del deterioro.

Las causas de la posible contaminación varía de las verduras a las frutas. En cuanto a los primeros contagios, en las verduras son los agentes telúricos y los presentes en las aguas de riego los de más peligro, mientras que en las frutas (a excepción de las que crecen bajo tierra y de tallo corto) intervienen los vehiculizados por el aire. Durante el transporte y el almacenamiento, las posibles causas de contaminación son comunes a ambas (50).

Las plantas poseen un sistema defensivo natural frente a los microorganismos que, aunque no tan eficaz impide hasta cierto punto su desarrollo. Los microorganismos presentes en mayor o menor cantidad en las superficies vegetales no pueden penetrar en las capas tisulares profundas de frutas y verduras porque disponen de una estructura tisular cerrada que protege al resto de la hortaliza no sólo del ataque microbiano, sino de ciertos agentes traumatizantes y de desecación. Además de éstas estructuras tisulares especiales, muchos vegetales poseen

sustancias químicas defensivas que abundan mucho más en las frutas verdes que en las maduras, como son: el ácido cítrico, málico, benzoico (conservador). Los taninos que existen en muchas frutas son también tóxicos para los microorganismos (19).

La flora natural superficial de los vegetales depende mucho del tipo de planta, además del clima y ubicación, por ej. al aire libre o en invernadero. También depende del estado o fase de desarrollo y en las frutas, sobre todo, del grado de maduración.

Las frutas que crecen cerca del suelo, como por ej. las fresas, se contaminan fundamentalmente a partir de los microorganismos del suelo.

El viento puede llevar los microorganismos del suelo a las frutas que no están directamente en contacto con éste. El polvo de la atmósfera, sobre todo en ausencia de humedad, es rico en microorganismos (19).

La calidad bacteriológica de los productos agrícolas está frecuentemente afectada por la contaminación fecal. La contaminación de las verduras está localizada sobre la superficie externa que incluyen las roturas naturales, pliegues y grietas de la planta.

Según GELDREICH los exámenes de laboratorio se deben limitar a superficies externas de aquellas porciones de las plantas que se comen crudas (18).

El manipuleo adicional ocurre cuando el producto agrícola llega a los mercados mayoristas y minoristas y es preparado para su distribución y venta al consumidor. Las prácticas de mercado, incluye a veces, desempaque, limpieza, clasificación y reempaque, algunas veces acompañado por rociado adicional con agua para mantenerlo fresco y son exhibidos al aire libre sin atender a las condiciones sanitarias (18).

El suelo, el agua, el aire, los insectos y otros animales, contribuyen a la microflora de los vegetales. De forma similar, el cultivo bien a mano o bien de forma mecánica, introduce y distribuye microorganismos en espacios ecológicos en los que antes estaban ausentes. Finalmente, la introducción de materiales de deshecho humano o de animales en el agua o en el suelo, tendrá un efecto obvio sobre la flora de los vegetales.

Los mecanismos mediante los cuales los microorganismos penetran en los tejidos no han sido todavía establecidos con exactitud, pero su presencia no es normalmente perjudicial para el crecimiento de la planta. En estas condiciones existe un equilibrio de coexistencia, que, sin embargo, puede ser roto bajo ciertas condiciones, iniciándose el deterioro de la planta. Las superficies externas de los vegetales que se encuentran en el campo soportan la mayor carga bacteriana, pero los tejidos interiores contienen en ocasiones, determinadas bacterias

que han llegado a penetrar por mecanismos desconocidos. (29,19).

La carga microbiana de las verduras y hortalizas crudas está influenciada por numerosos factores. Las manos del personal requerido para recolectar, desbastar, clasificar, atar y envasar, así como la maquinaria utilizada para estas operaciones, contribuyen a incrementar la tasa de microorganismos y a su distribución en el producto. La recolección daña a menudo el producto, dando como resultado la liberación de algunos nutrientes que favorecen el crecimiento de gérmenes que causan deterioro. Los contenedores y vehículos utilizados para el transporte son una fuente adicional de microorganismos.

Hay poca diferencia entre las hortalizas de raíz y las de hoja (verduras), a pesar de la mayor superficie expuesta por gramo vegetal en éstas últimas. El lavado puede eliminar hasta el 90% de la flora superficial, pero puede ser perjudicial puesto que el agua residual permitiría la rápida multiplicación de los microbios existentes. Los microorganismos se desarrollarán más rápidamente en los productos troceados, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes y agua (29).

Las bacterias son especialmente frecuentes en las verduras, cuyo pH es neutro, mientras que las levaduras

prefieren pH ácido, y están con más frecuencia en las frutas (19).

El elevado contenido de agua de éstos productos vegetales favorece la proliferación de las bacterias productoras de alteraciones.

La microflora de las verduras está formada por bacterias de los géneros *Alcalígenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* y *Micrococcus*. Además aparecen numerosos representantes de hongos por ejemplo especies de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia*. Los organismos estrictamente anaerobios que pueden encontrarse también presentes no han sido todavía bien caracterizados excepto algunos formadores de esporas termorresistentes de importancia en el deterioro de vegetales enlatados (19,29).

El potencial de óxido-reducción relativamente alto y la falta de una marcada capacidad de estabilización de las verduras y hortalizas explican que los organismos aerobios y anaerobios facultativos tengan más importancia que los anaerobios estrictos. Los agentes etiológicos que generalmente intervienen en el deterioro de las verduras son especies del género *Erwinia*, que se hallan asociadas en su medio ambiente natural con plantas y vegetales.

La forma común de deterioro producida por éstos organismos se denomina podredumbre blanda bacteriana que consiste en la descomposición de las pectinas dando lugar al reblandecimiento con disminución de la consistencia, a veces mal olor y con aspecto de empapada.

Aunque no se conozca bien la forma precisa en que *Erwinia spp.* lleva a cabo el reblandecimiento, es muy probable que estos organismos, que se encuentran en las verduras y hortalizas desde su recolección, subsistan en la savia de los vegetales mientras existan elementos nutritivos. La sustancia cementante de los vegetales induce la formación de pectinasas, que producen la hidrólisis de la pectina y, en consecuencia, la pérdida de la consistencia. Realmente, la pectinasa producida por estos organismos es una protopectinasa, puesto que la sustancia cementante presente en las plantas es la protopectina.

Estos microorganismos, al crecer precozmente y con relativa rapidez, hacen que los mohos proliferen en las superficies externas y que, por lo tanto, jueguen un papel menos importante en el deterioro de estos productos. Una vez que estos agentes, a través de la producción de pectinasas, han destruido la barrera vegetal externa, aquellos efectúan su penetración, llevando así a cabo la fermentación de los carbohidratos.

El crecimiento de los organismos invasores se ve favorecido por la presencia de compuestos nitrogenados simples, vitaminas (especialmente las del grupo B) y minerales, hasta que todo el material vegetal ha sido consumido o destruido. Probablemente, los malos olores son el resultado directo de los compuestos volátiles producidos por la propia flora, como son  $\text{NH}_3$ , ácidos volátiles, etc. En medio ácido, los microorganismos tienden a decarboxilar los aminoácidos con liberación de aminas, que originan la elevación del pH hasta la neutralidad o más allá. Los carbohidratos complejos, como la celulosa, son los últimos en ser degradados por una variada flora compuesta por mohos y otros organismos del suelo.

Los constituyentes aromáticos y las porfirinas probablemente no son atacados hasta el final de proceso, siendo también realizada esta acción por la flora del suelo.

Existe una gran diferencia en la carga microbiana que varía con la especie de verdura, el lugar, el clima y el estado de desarrollo.

Las bacterias son responsables del deterioro microbiano en un tercio aproximadamente de las pérdidas totales de los vegetales. Parece lógico esperar que los productos vegetales contengan patógenos en aquellos



cultivos en que los excrementos de animales se usan como fertilizantes.

Generalmente, los patógenos para el hombre y animales están ausentes en los vegetales frescos que no han recibido directamente el riego y fertilización con aguas servidas, que pueden contribuir a la aparición de agentes etiológicos de diversas enfermedades: hepatitis infecciosa, fiebre tifoidea, shigellosis, salmonelosis, gastroenteritis viral, cólera, amebiasis y otras enfermedades entéricas o parasitarias (19,29,48).

En los vegetales existen también una gran variedad de especies microbianas, si bien predominan los cocos sobre los bacilos, debido a su mayor resistencia frente a la desecación y la irradiación solar, ésta tiene un gran interés bajo el punto de vista de la cromogénesis microbiana (19).

Independientemente de la calidad bacteriológica del agua, si ésta contiene *S. typhi*, los productos irrigados serán contaminados; además, el incremento en la contaminación de alimentos dependerá de la calidad del agua y de las prácticas de cosecha y manejo de los alimentos en el mercado (8).

Se han descrito brotes de Salmonelosis atribuibles al consumo de apio, lechuga, col, endibia y berros contaminados. Las raíces, las hojas de crecimiento bajo y los tallos se contaminan mayormente por el uso de aguas

residuales, o aguas de irrigación contaminadas artificialmente (18).

El tiempo de supervivencia de coliformes, patógenos y virus entéricos en la mayor parte de los vegetales crudos es dependiente de la humedad y la temperatura, y se extiende más allá de la vida útil del producto (18).

Las verduras y hortalizas crudas han servido como vehículos para la introducción de microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella*, en instalaciones hospitalarias (18).

Evidencia de la presencia de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatógeno se encontró en una gran variedad de muestras de frutas y verduras de mercados en Ceylán. El origen de la contaminación se atribuyó al empleo de agua de irrigación, abono animal, portadores humanos y manipulación de dichos productos (18).

La recuperación de estos patógenos en sólo 1.1% de las muestras analizadas indican la baja incidencia de enfermedad causada por microorganismos a consecuencia de reconocidas prácticas sanitarias inadecuadas. Sin embargo, la baja incidencia no descarta el potencial de enfermedades causadas por productos agrícolas (6).

LANKIN y colaboradores (41) reportaron la supervivencia de *Salmonella* y otras enterobacterias en el suelo y sobre vegetales por semanas y aún meses.

RUDOLFS y col (69) confirmaron la supervivencia de *Salmonella* en hojas entre 20 y 40 días y en legumbres se determinó una supervivencia hasta de 10 semanas.

Cuadro No.1 Supervivencia de Patógenos y Coliformes totales en productos agrícolas contaminados y forraje.

ORGANISMO	PRODUCTO O FORRAJE	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA
Salmonella	Forraje Raíces cortadas Hojas vegetales Fresas Huertos cosechados	12 - > 42 días 10 - 53 días 1 - 40 días 6 horas - 5 días 18 horas ->2 días
Shigella	Forraje Hojas vegetales Huertos cosechados	< 2 días 2 - 7 días 6 días
Enterovirus	Raíces cortadas Hojas vegetales	15 - 60 días 15 - 60 días
Huevos de Ascaris	Hojas vegetales	27 - 35 días
Entamoeba histolytica	Hojas vegetales	< 2 - 3 días
Coliformes totales	Forraje Hojas vegetales	12 - 34 días 35 días

Fuente: Edwin E. Geldreich y Robert H. Bordner 1971.

## 1.2 MICROBIOLOGIA DEL SUELO

La contaminación biótica del terreno en determinadas ocasiones, puede tener repercusión sanitaria en zonas donde se cultivan frutas y verduras. El suelo, arable superficial, sin necesidad de ser regado con agua residual constituye el mayor depósito microbiano. Un gramo contiene hasta cinco mil millones de microorganismos y son muy pocas las especies microbianas que no pueden encontrarse en el suelo; junto con las formas vegetativas se han encontrado micelios fúngicos y esporas. La mayoría de la población microbiana es saprófita, los patógenos son muy pocos. Predominan las formas bacteriáceas heterótrofas y, entre ellas, las que pertenecen a la familia *Corinebacteriae*, hasta el 65%, seguida de esporulados (aerobios y anaerobios), 25%. Entre los hongos abundan los Actinomyceetales, géneros streptomices, *Nocardia* y *Microsporas* (47,19)..

Las tierras de cultivo pueden presentar alta concentración de microorganismos debido a la contaminación originada por animales silvestres en busca de alimento, uso de abonos y/o aguas de irrigación de pobre calidad. La recontaminación frecuente del terreno por aguas contaminadas o abonos animales puede contrarrestar los factores adversos para los microorganismos fecales y mantener grupos de indicadores bacterianos y patógenos por dos meses o más (19).

La interfase agua-tierra de las acequias puede constituir un reservorio de la contaminación fecal transportada en el canal. Existe una frecuencia más alta de *Salmonella* en el lodo cuando la densidad de coliformes fecales en las aguas es alrededor de 200 por 100 ml. Las muestras de tierras secas raramente contienen coliformes fecales y los que podrían encontrarse probablemente representan contaminación casual por contacto con animales silvestres, ganados o aves de corral (19).

A diferencia de aquellos microorganismos descargados en el ambiente acuático, las bacterias depositadas sobre suelos vía excreciones fecales, son inmovilizadas y están sujetas a la ecología de un sitio específico por lo tanto, la tierra no es un factor preponderante en la contaminación fecal de las plantas (19).

En el caso de las lagunas de estabilización, se trata a las aguas residuales mediante procesos biológicos. Las lagunas facultativas, como es el caso de las lagunas de San Juan (0.9-1.8 m. de profundidad) presentan variaciones en su contenido de oxígeno determinándose la formación de capas aerobias y anaerobias.

El mecanismo principal ocurre en el estrato aerobio y corresponde a una simbiosis o comensalismo de bacterias aerobias y algas. Las bacterias heterotróficas descomponen la materia orgánica produciendo compuestos

inorgánicos solubles y CO<sub>2</sub>, siendo la cantidad de oxígeno requerida suministrada principalmente por el proceso fotosintético.

En el estrato inferior anaeróbico, la degradación de la materia orgánica consta de dos fases y es realizada exclusivamente por bacterias. Las lagunas en serie maximizan la eficiencia de los sistemas, obteniéndose efluentes de mejor calidad en términos de demanda bioquímica de oxígeno, sólidos en suspensión, organismos patógenos, nitrógeno y fósforo (17).

En un estudio hecho en la ciudad de México se comprobó que la distribución de las bacterias patógenas en los suelos no es tan uniforme en la superficie como la de las bacterias indicadoras; esto quizá por el tipo de suelos y de cultivos, la periodicidad y calidad de los fungicidas, pesticidas y parasiticidas aplicados, así como el fertilizante y la concentración de las bacterias, lo que supone que en la medida en que el agua es de menor calidad bacteriológica, la concentración y viabilidad de bacterias patógenas en los suelos se incrementa (8).

*Salmonella* es más probable que sea encontrada en sedimentos profundos que exclusivamente en las aguas. Hendricks (1971), aisló salmonella de 0.6% de muestras de agua y de 4.6% de sedimentos profundos de una extensión de río bajo una caída de aguas residuales tratadas (15).

MALLMAN y LITSTKY (17) comprobaron que *S. typhi* no sobrevive más de 5 días en suelos arenosos, mientras que en suelos de tipo arcillosos se mantienen por 2 semanas, resultados que atribuyeron al contenido de materia orgánica de los suelos.

WATSON (67) registró una supervivencia cercana a 6 semanas en suelos arenosos mezclados con lodo que contenía una carga inicial de 250 a 300 *Salmonella*/kg. de peso húmedo. La cantidad de microorganismos presentes en los suelos depende del número original aportado al medio, además de las condiciones ambientales.

El contenido de humedad es determinante para la supervivencia e incluso repoblación de *salmonella* en suelos (17).

La supervivencia de *Salmonella* es más corta en suelos ácidos (pH 3.0-5.0) que en los neutros (pH óptimo 6.5-7.5) o alcalinos (17).



Cuadro No.2 Riesgo relativo a la Salud asociado con el  
uso agrícola de agua residuales.

CLASE DE PATOGENO	FRECUENCIA DE INFECCION O DE ENFERMEDAD
1.- Nemátodos Intestinales. Ascaris Trichuris Anquilostoma Necator	Alta
2.- Infecciones bacterianas Diarreas bacterianas (por ejemplo colera ) Tifoidea.	Media
3.- Infecciones Virales Diarreas virales Hepatitis "A"	Baja
4.- Infecciones por trematodos y céstodos --- Esquistosomiasis Cronorquiasis Teniasis	De alta o ninguna dependiendo de las circunstancias locales

FUENTE : Organización Panamericana de la Salud. " La declaración de Engelberg ". Hoja de divulgación técnica N. 37 , Febrero de 1987 (8).

### 1.3.0 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL GENERO SALMONELLA

La familia *Enterobacteriaceae*, comprende una serie de formas bacterianas que se le suelen agrupar en catorce géneros, uno de los cuales se asigna al género *Salmonella*. Este género debe su nombre a SALMON (1885) que, con SMITH, consigue su aislamiento por primera vez como agente etiológico de una enfermedad intestinal del cerdo y lo denominaron " *Bacillus cholerae suis*" y " *Bacillus sui pestifer*."

La taxonomía de las *Enterobacteriaceae*, familia bacteriana a la que pertenece el género *Salmonella*, está muy estudiada y, según la Clasificación Bergey (1984) es la siguiente:

CUADRO Nº3 CLASIFICACION DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEA

FAMILIA	GENERO
Enterobacteriaceae	I Escherichia
	II Shigella
	III Salmonella
	IV Citrobacter
	V Klebsiella
	VI Enterobacter
	VII Erwinia
	VIII Serratia
	IX Hafnia
	X Edwardsiella
	XI Proteus
	XII Providencia
	XIII Morganella
	XIV Yersinia

FUENTE: María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología  
alimentaria 1989.

1.3.1

CARACTERES MORFOLOGICOS Y CULTURALES:

El género *Salmonella* está integrado por bacilos Gram negativos, no esporulados, de 1.0 - 3.0 x 0.4 - 0.6 micras . Generalmente son móviles mediante flagelos peritricos, excepto especies mutantes inmóviles y otras, como *S. gallinarum* y *S. pullorum* que son siempre inmóviles.

El aspecto normal es siempre granulosa (*S. abortus ovis*, *S. typhi suis*), de pared mucosa (especialmente en las *S. paratyphi* B d-tartrato) colonias enteramente mucosas ( en especial en las *S. paratyphi* B aisladas de portadores sanos ). Las especies mucoides pueden presentar, a veces, cápsulas (11,45).

### 1.3.2 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

Las principales reacciones bioquímicas de *Salmonella* se relacionan en el siguiente cuadro:

CUADRO Nº 4 PRINCIPALES REACCIONES  
BIOQUIMICAS DE SALMONELLA

<u>Prueba o Sustrato</u>	<u>Resultado</u>
- Producción de SH <sub>2</sub> sobre agar (T.S.I b)	+
- Producción de ureasa (Christensen)	-
- Producción de Indol	-
- Rojo de metilo (37°C)	+
- Acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer)	-
- Utilización de citrato (Simmons) como fuente de carbono	d
- Tolerancia KCN	-
- Movilidad	+
- Licuación gelatina (22°C)	-
- Producción de lisina decarboxilasa d)	+
- Producción de arginina dihidrolasa	+ o (+)
- Producción de ornitina decarboxilasa	+

- Producción de fenil alanina deaminasa	-
- Fermentación glucosa con formación de ácido	+
- Fermentación de glucosa con formación de gas a)	+
- Fermentación:	
Lactosa c)	-
Sacarosa e)	-
Manitol	+
Dulcitol	d
Salicina	-
Adonitol	-
Inositol	d
Sorbitol	+
Arabinosa	+ o (+)
Rafinosa	-
Ramnosa	+
Maltosa	+
Xilosa	+
Trehalosa	+
Celobiosa	d
Melibiosa	+
- Utilización:	
Malonato f)	-
Mucato	d
Tartrato	+ o (+)
Glicerol	d
Acetato sódico	d
- Reducción de betagalactosidasa (ONPG)	-
- Reducción de nitratos	+
- Hidrólisis de la esculina	-
- Producción de citocromo oxidasa	-
- Utilización de ácidos orgánicos:	
D-tartrato	+ o (+)
i-tartrato	d
l-tartrato	d
-----	
diferentes reacciones: +, (+), -	

- (+)= reacción positiva después de 3 o más días
- a)= hay serotipos que no producen nunca gas (S.typhi, S. gallinarum); otros son, a veces, agasógenos (S. dublin)
- b)= algunos serotipos no producen nunca SH2 (S. paratyphi A)
- c)= S. arizonae fermenta la lactosa
- d)= S. paratyphi A y S. arizonae son variables
- e)= S. arizonae fermenta
- f)= subgrupo II y III positivos (45)

La clasificación de *Salmonella* según su estructura antigénica se basa en el esquema de KAUFFMANN-WHITE. Las cepas de *Salmonella*, además de responder a sus características bioquímicas perfectamente estudiadas, poseen una estructura antigénica que juega un papel importante en su tipificación. Se trata de un cuadro simplificado de los aglutinógenos pertenecientes a los distintos serotipos de este género bacteriano. Estos aglutinógenos se ponen de manifiesto al contactar con sus anticuerpos específicos por el método de aglutinación. El esquema establece una nomenclatura para designar a los diferentes serotipos y los clasifica de acuerdo con sus fórmulas antigénicas.

En la actualidad existen unos 2,000 serotipos clasificados y definidos individualmente.

En general, todas las cepas de *Salmonella* están relacionadas entre sí desde el punto de vista antigénico.

El antígeno somático (O), situado en la pared bacteriana es de naturaleza



glúcido-lípida-poliipeptídica. Termoestable, ya que resiste la acción de una temperatura de 100°C durante dos horas. Estable al alcohol. Su aglutinabilidad se ve afectada por la acción del formol al 5 por mil. Interviene en el poder patógeno del germen. Aglutina con sus anticuerpos homólogos y la aglutinación que se produce es lenta, fina y granular.

El antígeno flagelar (H), situado en los flagelos de las formas móviles, es de naturaleza proteica. Termolábil, ya que se destruye a 100° C durante 30 minutos. Inestable al alcohol. Su aglutinabilidad no se inhibe por la acción del formol al 5 por mil.

No interviene en el poder patógeno de *Salmonella*. Aglutina con sus anticuerpos correspondientes de forma rápida, dando lugar a flóculos grandes que se disgregan fácilmente. Se presenta en dos fases:

Tipos monofásicos, con una sola fase H: *S. typhi*.

Tipos difásicos, con dos fases H: *S. paratyphi B*.

El antígeno Vi, rodea la pared bacteriana más o menos completamente. Este antígeno no existe en todos los serotipos de *Salmonella*. Su presencia impide la aglutinación de los antígenos somáticos (O), que se encuentran debajo. Para poder determinar la presencia del antígeno somático (O), es necesario destruir el antígeno Vi por calentamiento. Sólo existen cepas de *S. typhi*, *S. paratyphi* C y en ocasiones, aparece en *S. dublin*. Es termolábil.

Aglutina lentamente y la aglutinación que produce es fina y granulosa.

Utilizando la seroterapia a base del fraccionamiento antigénico, se llegó a la individualización de los serotipos. Con las técnicas biológicas (basadas en fermentaciones) se seleccionan los biotipos y mediante el tipado se consigue establecer los distintos fagotipos de interés epidemiológico.

A continuación presentamos una lista de las cepas de *Salmonella* más corrientes y clasificadas según el grupo antigénico:

GRUPO	TIPO
B	<i>S. paratyphi B</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. agona</i> <i>S. saint paul</i> <i>S. derby</i> <i>S. heidelberg</i>
C1	<i>S. cholera suis</i> <i>S. montevideo</i> <i>S. oranienburg</i> <i>S. thompson</i> <i>S. infantis</i>
C2	<i>S. newport</i> <i>S. nuenchem</i>
D	<i>S. enteritis</i> <i>S. dublin</i>
E	<i>S. anatum</i> <i>S. meleagridis</i> <i>S. londien</i>

Las posibles mutaciones de estos gérmenes pueden estar influenciadas por la ecología, con evidentes repercusiones en la patogenia.

Las mutaciones tienen lugar cuando se produce una alteración en el ADN cromosómico microbiano, originándose en la estirpe afectada variaciones de distinta

naturaleza. Esto justifica la aparición de  
nuevos sero, bio y fagotipos (11,30,45,50).

#### 1.3.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MULTIPLICACION DE SALMONELLA

El número de *Salmonella* necesario para originar una toxiinfección depende de muchos factores, unos dependientes del propio germen, su sensibilidad a los factores ambientales, los grados de virulencia de los distintos serotipos y la susceptibilidad del huésped (39,45,50).

##### 1.3.4.1 Factores ambientales

Entre los factores ambientales que tienen influencia en su crecimiento, supervivencia y muerte tenemos:

##### 1.3.4.1.1 Temperatura

*Salmonella* resiste hasta tres meses en el medio ambiente cuando encuentra condiciones favorables de temperatura (50).

Puede crecer entre límites de 5°C y 47°C , con ligeras variaciones según los serotipos, sobreviviendo

mejor a temperaturas bajas. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (17,50).

Una temperatura de 60°C destruye algunos serotipos en cinco minutos, otros, a la misma temperatura persisten 10 o 15 minutos.

Por debajo de 5°C no se multiplican pero pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo, sobre todo en alimentos congelados (45,50).

FOSTER Y MEDD (1976) demostraron que las salmonellas sobreviven en pechuga de pollo picada mejor a -20° C (entre 60 y 83 % permanecían viables al cabo de 126 días) que a -2 y -5° C, temperaturas a las que solo sobrevivieron 1.3 y 5.8%, respectivamente, al cabo de 5 días.

Los microorganismos gram-negativos, como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Vibrio* y *Salmonella*, son más sensibles a la congelación que los gram-positivos.

GEORGALA y HURST (1963) han comprobado que pueden encontrarse *S. enteritidis* y *S. typhimurium* en helados mantenidos durante siete años a  $-23^{\circ}\text{C}$ . El frecuente aislamiento de *Salmonella* en numerosos productos congelados tales como huevos, pescado, carne y productos lácteos y platos precocinados constituye una clara prueba de que la congelación no salvaguarda contra la posibilidad de contraer salmonelosis a través de los alimentos.

La temperatura mínima de crecimiento de

Salmonella en los alimentos es de alrededor de 5.3° C (28,38).

Salmonella puede viajar a distancias considerables en arroyos y ríos, especialmente en aguas a bajas temperaturas (SPINO 1966) (15).

La supervivencia es muy prolongada a bajas temperaturas y algo prolongada en la oscuridad.

Las temperaturas a través de las cuales Salmonella puede sobrevivir durante más tiempo en el medio ambiente se consideran por debajo de los 10°C (1 a 5°C) (17).



#### 1.3.4.1.2 pH

*Salmonella* crece en límites de pH comprendidos entre 4.5 y 9.0. La escala óptima es de 6.5 - 7.5. El pH mínimo varía con el serotipo, temperatura de incubación y actividad de agua ( $a_w$ ) del medio o alimento donde se desarrolle el germen. A valores de pH inferiores a 4.5 y superiores a 9.0, las cepas de *Salmonella* mueren lentamente o son inactivas (45,50).

#### 1.3.4.1.3 Actividad del agua ( $a_w$ )

*Salmonella* no se reproduce a una actividad de agua ( $a_w$ ) inferior a 0.94. Su crecimiento óptimo se produce a 0.99 variando algo entre los distintos serotipos.

A tasa inferior a 0.94 mueren gradualmente.(45).

Son fácilmente inactivadas por la pasteurización en los alimentos que las contienen, cuando el coeficiente  $a_w$  es superior a 0.95 si desciende este coeficiente, aumenta la resistencia (50). *Salmonella* spp. crece bien sobre muchos alimentos cuya  $a_w$  es alta; estos microorganismos, al igual que muchas otras *Enterobacteriaceae*, son excelentes competidores en floras mixtas, a menos que los microorganismos que compiten, reduzcan rápidamente el pH. La *Salmonella* se multiplican cuando la  $a_w$  es de 0.97, a una velocidad equivalente a la mitad de su velocidad máxima y alrededor de un cuarto si la  $a_w$  es de 0.96 (28).

Este género bacteriano puede vivir bastante tiempo en alimentos desecados, aún en condiciones adversas de temperatura y pH. Si estos alimentos se consumen sin tratamiento térmico, con tratamiento térmico, con tratamiento térmico inadecuado o si se reconstituyen y mantienen en condiciones favorables para el desarrollo bacteriano, se convierten en un peligro real para la salud (45).

#### 1.3.4.1.4 Factores químicos

Entre los inhibidores bacterianos de naturaleza química tenemos la forma no disociada del ácido nítrico, ingrediente activo del nitrito, a la cual son particularmente sensibles las salmonellas (45).

Existen muchos productos curados, en los cuales las salmonellas no son inhibidas por la sal, ni por el nitrito, ni por el pH. Sin embargo, la combinación de pH, ClNa (aw), Nitrito de sodio y una temperatura reducida pueden tener efectos diferentes. *Salmonella taphimurium*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* son más sensibles al nitrito de sodio, en presencia de ClNa a 10°C, que a 15 - 35°C (ALBALAS y ROBERTS, 1977) (28).

Los ácidos grasos volátiles tienen acción inhibidora sobre estos gérmenes. *Salmonella* se inactiva por los detergentes, desinfectantes y el agua caliente habitualmente utilizados en

las prácticas de limpieza (45).

Los alimentos fuertemente salados como salchichas saladas con tripa constituye un medio letal para *Salmonella*. Mueren igualmente en salmueras a temperatura ambiente pero sobreviven mejor en salmueras refrigeradas (28).

El ozono es usado como agente desinfectante de aguas contaminadas con *Salmonella* (44).

#### 1.3.4.2 Virulencia

Con respecto a la virulencia, los distintos serotipos y las distintas cepas exhiben diferentes grados de virulencia. A veces números muy bajos de *Salmonella* de una especie pueden causar enfermedad. Esta dosis baja puede estar ligada con la composición química del alimento tales como alto contenido de grasas que protegen al

microorganismo en su paso por el estómago (39).

Se ha establecido cifras para algunos serotipos: *S. meleagridis* 750,000 a 30 millones; *S. anatum* 3 a 45 millones; *S. newport* de 150,000 a 450,000; *S. derby* 45 millones, *S. bereilly* de 125,000 a 1 millón y *S. typhimurium* alrededor de 1 millón (50).

Algunos serotipos de *Salmonella* son más virulentos que otros, sin embargo, se acepta de modo general que todos los serotipos de *Salmonella* son potencialmente peligrosos para el hombre (27).

#### 1.3.4.3 Suceptibilidad del huésped

Las poblaciones más sensibles son los niños, los ancianos, los mal nutridos, aquellas personas que sufren o son convalecientes de otras enfermedades y también cuando aparecen los primeros brotes originados por serotipos nuevos. En estos casos se trata de ausencia de inmunidad

colectiva en la región afectada  
(39,50).

#### 1.4.0 METODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE SALMONELLA

Existe una proliferación de técnicas analíticas ciertamente variada para conseguir aislar *Salmonella* en productos alimenticios.

El procedimiento de detección de *Salmonella* en alimentos puede abreviarse por la técnica de anticuerpos fluorescentes aplicada a los caldos selectivos de enriquecimiento y por los métodos serológicos realizados también a este nivel de enriquecimiento selectivo. Existen asimismo, técnicas inmunoenzimáticas. La mayoría de estas técnicas son largas y costosas, con el inconveniente de que ninguna es óptima para toda clase de alimentos, no existiendo aún una técnica definida que se pueda aplicar a todos los alimentos o todos los serotipos de *Salmonella* (42,45).

La complejidad de los métodos se debe al hecho de que las cepas de *Salmonella* están diseminadas entre la contaminación fecal, por lo que, en los alimentos se encuentran mezcladas con numerosos microorganismos contaminantes, los cuales soportan mejor que *Salmonella* las condiciones ambientales, desarrollándose más que ellas (45).

POST Y RIEMANN (1967) recomendaron que las técnicas para recuperar *Salmonella* deben ser adaptadas al material



a ser analizado, ya que, un factor importante parece ser el tipo de bacterias competidoras presentes en el producto a ser analizado (3).

Teniendo en cuenta estas circunstancias, las técnicas aplicadas al aislamiento de tales bacterias, tienden a favorecer su crecimiento y a retardar o suprimir el de la flora contaminante (otras bacterias intestinales las cuales se parecen en morfología, fisiología y en su hábitat) que les pueden acompañar (3, 45).

El aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos requiere una metodología distinta a la utilizada para muestras clínicas ya que hay que considerar que están expuestas a condiciones diferentes a las de su ambiente habitual, el tracto intestinal del hombre y los animales. Por otra parte, durante el procesamiento, elaboración y tratamiento de los alimentos, estos gérmenes y otros, están expuestos a la acción de diversos factores: calor, desecación, acidez, conservadores y otros que lesionan su vitalidad. Además, se ven obligados a convivir con otros gérmenes competitivos propios de la flora normal del alimento que, igualmente, alteran su forma de vida habitual (38,45).

Por todas estas razones, los métodos utilizados para el aislamiento de *Salmonella* van encaminados a aumentar

su supervivencia, favorecer su multiplicación y suprimir el crecimiento de la flora competitiva.

En la metodología deben de tenerse en cuenta:

- La utilización de altos inóculos, no inferiores a 25 gramos de muestra.
- La neutralización de los productos ácidos para que el producto no alcance un pH inferior a 6.0, ya que sería perjudicial para la *Salmonella*.
- La utilización de medios líquidos de enriquecimiento selectivos que inhiban el crecimiento de la flora competitiva siendo, en algunos casos, aconsejable una fase de pre-enriquecimiento.

Existe acuerdo en cuanto al establecimiento de unas etapas dentro de la sistemática para el aislamiento e identificación de *Salmonella*:

- 1) Pre-enriquecimiento en medios líquidos no selectivos.
- 2) Enriquecimiento en medios líquidos selectivos.
- 3) Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos.
- 4) Confirmación serológica de las colonias sospechosas.

En casos de presunta infección alimentaria por *Salmonella*, la detección de estas bacterias es más fácil, por lo que se pueden suprimir algunas fases de la técnica, sobre todo la de pre-enriquecimiento que es evidente que cuando se trata de una infección por *Salmonella*, éstos gérmenes se han desarrollado de forma

óptima sobre determinado alimento, por lo que en número y vitalidad son capaces de desarrollar la enfermedad (38,45).

Con fines epidemiológicos, puede ser necesario conocer el número de **Salmonella** que contiene el alimento sospechoso de haber producido casos de salmonelosis. En estas circunstancias se debe adaptar la técnica para hacer factible dicho recuento.

#### 1.4.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA IDENTIFICACION DE SALMONELLA

La lista de medios apropiados para la identificación de *Salmonella* es amplia y sigue extendiéndose.

1) Pre-enriquecimiento no-selectivo.- En esta fase se revivifican las cepas de *Salmonella* para permitir su recuperación y aumentar su vitalidad, sobre todo en aquellos alimentos que en el curso de su preparación o conservación han cumplido ciertos tratamientos que comprometen su fisiologismo normal. Dichos tratamientos originan la lesión subletal de las bacterias, en cuyas condiciones no están capacitadas para desarrollarse en los medios de aislamiento.

Esta etapa debe cumplir las siguientes funciones:

1. Rehidratar la célula. ANDREWS, 1983 (2).
2. Suministrar los nutrientes para que las cepas de *Salmonella* se multipliquen y aumenten en cantidad en relación a su flora acompañante.
3. Reparar de las células dañadas (ANDREWS, 1985).
4. Diluir los tóxicos o sustancias inhibitorias que puedan estar presentes en la muestra.

Los medios de pre-enriquecimiento que se utilizan en la práctica son varios (depende de los alimentos que se analizan). los más comunes son:

*Caldo lactosado.*- En este medio, cuando existe flora muy mezclada, los gérmenes fermentadores de la lactosa,

al multiplicarse hacen que descienda el pH con lo que se inhibe el crecimiento de cierta flora, pero permite vivir y desarrollarse a las cepas de *Salmonella*. A veces ocurre que el nivel de pH baja excesivamente (4.5) durante la incubación, en cuyo caso, también se inhibe la multiplicación de *Salmonella* (27,45).

También puede usarse *Caldo nutritivo* (10,38), *Caldo soya tripticase* (38), *Agua peptonada* (16), *leche en polvo descremada reconstituída* (2, 27, 38).

El uso de *Agua peptonada tamponada* (Buffer Peptone Water: BPW) se ha incrementado en los últimos años porque mantiene un pH que favorece el crecimiento de las cepas de *Salmonella*. La peptona y los fosfatos, por otra parte, revitalizan al germen. Los medios de pre-enriquecimiento no contienen sustancias inhibidoras (27, 38, 45).

En los alimentos crudos o no procesados, se podría evitar esta etapa, ya que es poco probable que en ellos estén lesionadas las cepas de *Salmonella* e incluso, con el pre-enriquecimiento, se podría producir un crecimiento excesivo de la flora competitiva (SILLIKER,19, DUBEL Y FAGON 1964). Sin embargo, nunca puede haber seguridad de que las cepas de *Salmonella* no estén lesionadas.

También son recomendados *Medios mínimos*, como el M-9 con glucosa y sales inorgánicas, para la recuperación de *Salmonella* estresadas por el calor o por el uso de

antibióticos (GOMEZ, SINSKEY y LABUZA, 1973; GOMEZ y SINSKEY, 1974).

Se ha visto que la recuperabilidad de *Salmonella* es igualmente efectiva al utilizar medios ricos en nutrientes o medios simples (38,45).

Si el alimento tiene un alto contenido graso, se recomienda agregar al medio sustancias surfactantes como *Tergitol aniónico 7*, *Tween 80*, *Tritón X-100* . El papel de estos agentes sería dispersar los lípidos que pueden tener atrapadas las cepas de *Salmonella* y así dejar libres estas bacterias que pasarían al medio líquido pudiendo así ser fácilmente recuperadas (D'AOUST et al 1982) (10,38).

Tradicionalmente la incubación de estos caldos es de 16 a 24 horas a 35-37°C. Se ha ensayado acortar este período pero esto ha traído polémica ya que un período de incubación de 6 o menos horas trae consigo el reporte de muchas muestras falsas negativas. Además un período de 6 horas no es suficiente para la reparación de las células de *Salmonella* dañadas ya sea en caldo soya tripticasa o en caldo lactosado (Van Schothorst et al 1972). Para productos congelados se ha probado incubar primero unas horas a 25°C y después a 35-37°C con buenos resultados.

2) Enriquecimiento en medios líquidos selectivos.- La función de estos medios es facilitar el desarrollo de *Salmonella* e inhibir el crecimiento de la flora

competitiva acompañante en el alimento, tales como Coliformes, Proteus y Pseudomonas (38, 45).

Los medios de enriquecimiento deben reunir ciertas características:

- Ser lo suficientemente selectivos para prevenir el crecimiento excesivo de competidores.
- Mantener constantemente su selectividad.
- Ser capaces de recuperar todos los serotipos.

Los medios de enriquecimiento selectivo llevan en su composición sustancias inhibidoras que suprimen o retardan el crecimiento de la flora microbiana contaminante favoreciendo, por el contrario, el crecimiento de *Salmonella*.

La utilización de un solo medio de enriquecimiento selectivo no satisface todas las exigencias.

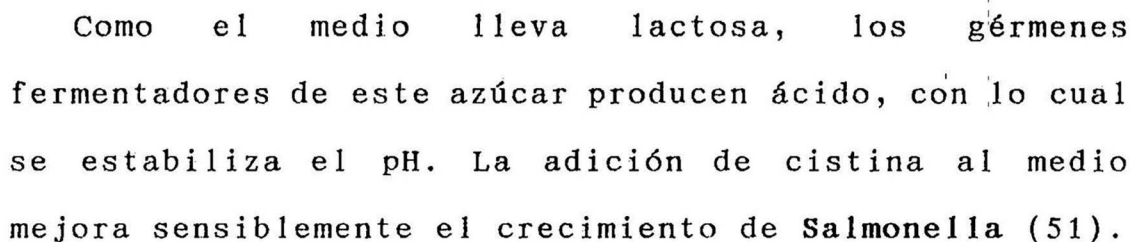
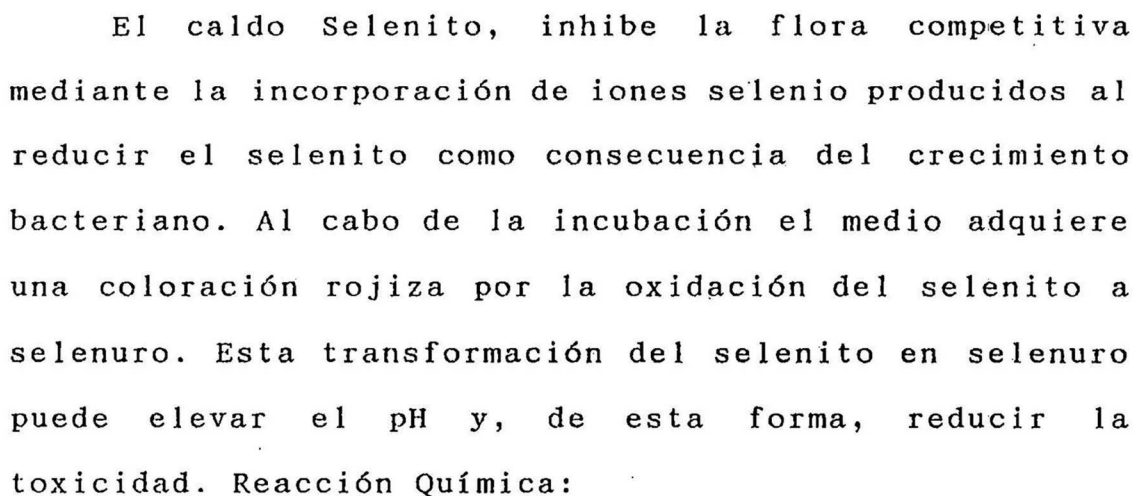
Los medios más usados hasta hace poco son dos grupos de medios: unos que tienen como base el tetracionato y otros cuya base es el selenito.

El tetracionato inhibe el crecimiento de coliformes mientras que las sales biliares y el verde brillante lo hacen con los gérmenes gram-positivos. Las sales biliares actúan estimulando también el crecimiento de *Salmonella*. Originalmente el medio no contiene tetracionato éste se forma por oxidación del tiosulfato sódico debido al yodo contenido en la solución de Lugol. El tetracionato formado se descompone en ácido sulfuroso y azufre; el

Salmonella (pero también Proteus y algunos otros gérmenes) reduce al tetracionato y por lo tanto no son inhibidas (51,24).

$$2\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 + \text{I}_2 \longrightarrow \overset{+}{\text{Na}}\overset{-}{\text{O}}\text{SSSO}_3\text{Na} + 2\text{INa}$$

Tiosulfato                      Tetrarationato





Sin embargo, los enriquecimientos en caldo selenito y tetratiónato son tóxicos para ciertos serotipos de *Salmonella* (10).

En el año 1956, RAPPAPORT y colaboradores describieron un método de enriquecimiento en el que el cloruro de magnesio y el verde malaquita son los componentes principales. La ventaja del medio es que se puede lograr un buen aislamiento de *Salmonella* al realizar un sólo paso de enriquecimiento.

El principio de este medio de Rappaport está fundamentado en la buena supervivencia de *Salmonella* en elevadas concentraciones de sales. Mientras que las bacterias coliformes se deshidratan en presencia de soluciones hipertónicas ( $MgCl_2$  4%), *Salmonella* y *Shigella* se mantienen viables (47,60,61).

Posteriormente, en 1976 (VASSILIADIS y col.) introdujeron como un medio de enriquecimiento para aislar *Salmonella*, una modificación del Caldo Rappaport el cual lo hace adecuado para la incubación a 43°C (60,61,62,63,64).

En la actualidad el medio Rappaport-Vassiliadis (RV) ha sido aceptado por la ISO después de haber dado mejores resultados ya que es un medio con una alta recuperabilidad, fácil de preparar en el laboratorio y económico. Este medio lleva como base en su composición el cloruro de magnesio y verde de malaquita con la

reducción en un tercio de la cantidad de verde de malaquita contenido en la formulación original del medio Rappaport (38,45).

El Verde de Malaquita y el Cloruro de Magnesio inhiben notablemente el crecimiento de la flora intestinal normal, en tanto que la mayoría de *Salmonella* se multiplica sin obstáculo.

La adición de novobiocina sódica a los medios de cultivos, ya sea a los caldos de enriquecimiento (JEFFRIES 1959, ALCAIDE 1982,1984) ó a los agares de aislamiento selectivo (HARGROVE y col 1971, HOBEN y col. 1973, RESTAINO y col 1977) incrementa la recuperación de *Salmonella* debido al efecto inhibitorio que ofrece el antibiótico sobre otras bacterias, tales como *Proteus*, *Pseudomonas* y *Coliformes* que constituyen la flora acompañante, sin afectar el crecimiento de *Salmonella*.

Como los diversos serotipos de *Salmonella* suelen tener distinta sensibilidad a las sustancias inhibidoras de los medios de enriquecimiento, se aconseja el empleo de dos medios diferentes para cada prueba (45).

La proporción de siembra en estos medios generalmente es de 1:10.

Las temperaturas de incubación empleadas son 35-37°C y 43°C. La incubación a 35-37°C se realiza ante la posibilidad de que alguna *Salmonella* pudiese ser inhibida a 43°C.

### 3) Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos.

En esta fase se restringe el crecimiento de la flora competitiva y se estimula el crecimiento de *Salmonella*. Por otra parte, se hace factible el reconocimiento de las colonias crecidas según unas características peculiares.

Los medios sólidos en general, están constituidos por un agar sólido básico adicionado de colorantes, sales biliares, antibióticos y/o sustancias químicas que inhiben el crecimiento de la flora competitiva.

Suelen llevar incorporado un sistema indicador para diferenciar las cepas de *Salmonella*, basándose en la producción de SH<sub>2</sub> y/o la fermentación de determinados carbohidratos como lactosa, sacarosa o xilosa, principalmente.

Los medios sólidos selectivos de aislamiento, según su acción inhibidora sobre las bacterias Gramnegativas se pueden dividir en:

- Poco selectivos: Agar Mac Conkey.
- Moderadamente selectivos y diferenciales: Agar citrato desoxicolato, Agar SS (*Salmonella-Shigella*), Agar Hektoen, Agar XLD.
- Altamente selectivos y diferenciales: Agar Verde brillante (AVB), Agar Bismuto Sulfito.

Ninguno de ellos es ideal para todas las cepas de *salmonella* (39).

El Agar verde brillante rojo de fenol (AVB) es un medio altamente selectivo. El colorante verde brillante suprime la flora Gram positiva y gérmenes como *S. typhi* y *Shigella*. La fermentación de la lactosa se reconoce por el viraje del medio a color amarillo debido al indicador de pH (rojo de fenol). El ambiente alcalino produce un color rojo. Si se agregan sustancias inhibidoras como sulfadiazina, sulfapiridina, sulfanilamida al medio se suprimen también *Proteus* y *Pseudomonas*.

Es aconsejable incluir en la metodología, al menos, un medio de la categoría de selectividad moderada, como por ejemplo Agar Hektoen. Este medio, aún cuando posee suficiente efecto represor de la flora de acompañamiento, ejerce escasa inhibición de *Salmonella* y *Shigella* y, por lo tanto, permite la obtención de altos rendimientos en éstos gérmenes.

Las sales biliares de este medio inhiben el crecimiento de las bacterias competitivas. En su composición forman parte dos indicadores, azul de bromotimol y fucsina ácida, por cuya acción las colonias lactosa positivas muestran una expresiva diferencia cromática frente a las colonias lactosa negativas. Igual ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente a la lactosa y más fácilmente a la sacarosa y a la salicina, lo que impide hallazgos patógenos falsamente positivos. La combinación de tiosulfato, como sustancia

reaccionante, y una sal de hierro como indicador, hace que se manifieste un color negro en las colonias productoras de hidrógeno sulfurado.

HOBEN y colaboradores (1973) recomiendan una adición de Novobiocina, a razón de 10 hasta 20 ug/ml de medio de cultivo, con el fin de mejorar la selectividad. La adición de Novobiocina, inhibe los *Proteus* y *Citrobacter* que suelen formar colonias parecidas por su aspecto a las de *Salmonella* (40).

El Agar Rambach, es un nuevo medio usado en el análisis de rutina para el aislamiento de *Salmonella* en muestras clínicas y de productos alimenticios. Permite detectar las colonias de *Salmonella* eficientemente aún cuando están presentes grandes cantidades de bacterias coliformes.

Este medio se basa en una nueva característica fenotípica, la formación de ácido de propilen glicol e hidrólisis de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosido (X-GAL) para la diferenciación de *Salmonella* spp. de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (37,46).

La incubación de las placas se hace generalmente a 35-37°C durante 24 horas, sin embargo, hay autores que recomiendan 41.5 - 43°C (45).

#### 4) Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas

Esta confirmación se lleva a efecto sobre las colonias sospechosas crecidas en las placas de Petri conteniendo los medios selectivos de agar. En esta fase, por la selección bioquímica de los gérmenes, se puede llegar a la identificación de *Salmonella* a nivel de género.

Para la confirmación se seleccionan de 3-5 colonias bien aisladas de cada placa (45).

Los medios de cultivo recomendados son Agar hierro tres azúcares (TSI) y Lisina hierro agar (LIA).

En el medio TSI (Agar hierro tres azúcares), se pueden realizar varias pruebas:

- Fermentación de la glucosa, con o sin producción de gas.
- Fermentación de la lactosa, sacarosa.
- Producción de SH<sub>2</sub>.

En este medio, la glucosa es utilizada en anaerobiosis, en el fondo; cuando fermenta este azúcar se produce una acidificación del medio que se manifiesta por la aparición de un color amarillo por viraje del indicador (rojo fenol). Esta fermentación se puede acompañar de producción de gas (O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>) con formación de burbujas, separación del medio de las paredes del tubo y, a veces, cuarteamiento del mismo.

La lactosa y sacarosa se utilizan en aerobiosis, en la parte de la pendiente del medio. Cuando este azúcar

fermenta, se produce una acidificación que se manifiesta por la aparición de un color amarillo en la pendiente del medio.

El sulfato ferroso sirve de indicador de SH<sub>2</sub> ya que, cuando se reduce, se transforma en sulfuro, de color negro.

El medio Lisina-hierro-agar (LIA), es muy útil para la clasificación bioquímica de numerosos gérmenes Gram-negativos.

Numerosas bacterias poseen enzimas que son capaces de atacar distintos aminoácidos. Entre estas enzimas están las decarboxilasas: ornitina decarboxilasa, arginina dihidrolasa y lisina decarboxilasa.

Estas enzimas, favorecidas en medio ácido, forman sustancias alcalinas que hacen virar al medio a partir de ácidos aminados.

La lisina, bajo la acción de una decarboxilasa que no aparece más que en medio ácido, se transforma en cadaverina. La reacción positiva indica que ha sido utilizado el aminoácido manifestándose por la aparición de un tinte violeta o rojo violeta del medio. En los gérmenes decarboxilasa negativos el color del caldo es amarillo.

## PRUEBAS BIOQUIMICAS ADICIONALES

### a) Siembra sobre Caldo triptonado para la determinación de indol

Algunas bacterias desaminan e hidrolizan el triptófano contenido en la peptona, hasta formar indol.

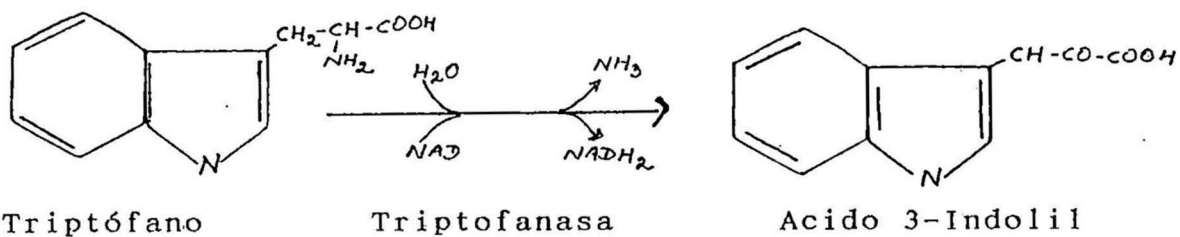
El medio utilizado es el caldo triptonado. Las bacterias indol positivas escinden el triptófano del medio originando amoníaco, ácido pirúvico e indol. En caso de que se produzca indol, reacciona con el paradimetilaminobenzaldehído, en medio ácido, del reactivo de Kovacs, dando lugar a un compuesto complejo coloreado, soluble en solventes orgánicos, especialmente en el alcohol amílico, produciéndose un anillo de color rojo cereza y el microorganismo es Indol positivo. Esta reacción se produce por un proceso de condensación formado por un desdoblamiento ácido de la proteína.

La reacción de color se basa en la presencia de la estructura pirrólica en el indol, formando el complejo quinoidal.

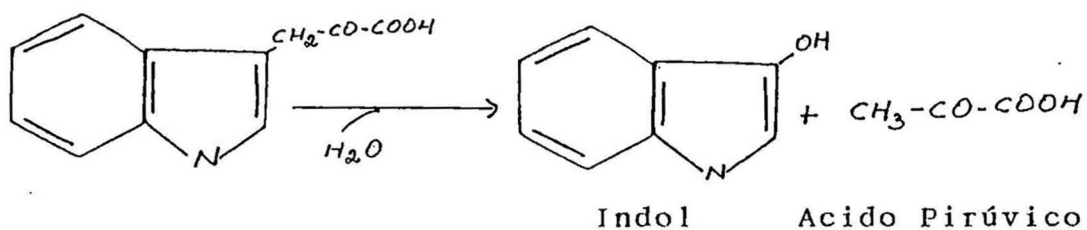
La estructura pirrólica puede reaccionar en sus formas tautoméricas (36,50).



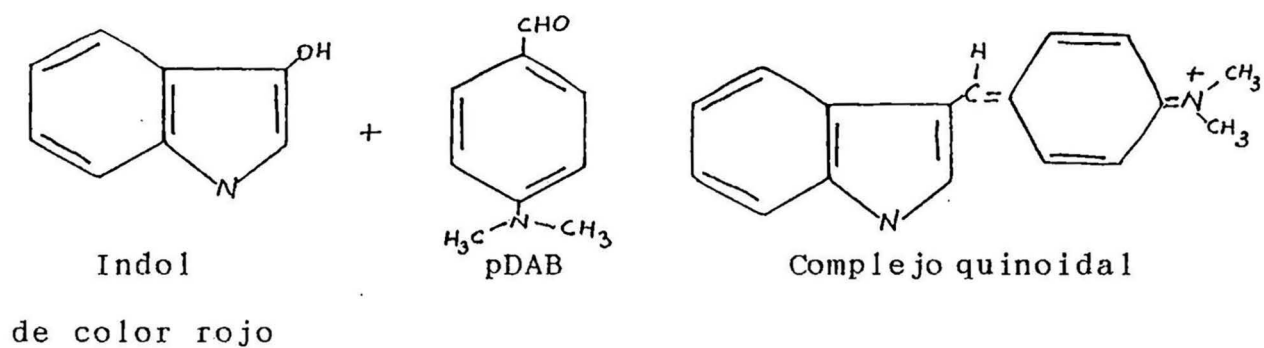
## PRODUCCION DEL INDOL



Pirúvico



Reacción del indol con el p-dimetilaminobenzaldehído  
(pDAB)



b) Prueba del Rojo de metilo

La mayoría de los glúcidos absorbidos por las bacterias se convierten en glucosa que, en anaerobiosis, se degrada hasta formar ácido pirúvico. De este ácido, se obtienen ácidos orgánicos de cadenas cortas que mantienen el pH del cultivo lo suficientemente bajo para que el rojo de metilo mantenga la coloración roja (pH inferior a 4.4) durante 2-3 días.

Reacción positiva: coloración roja (pH inferior a 5).

Reacción negativa: coloración amarilla (pH igual o superior a 6.3) (51).

c) Prueba de Voges -Proskauer

Esta prueba es usada para determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

La reacción se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.

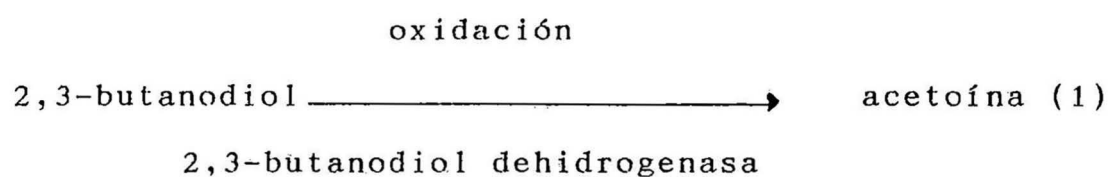
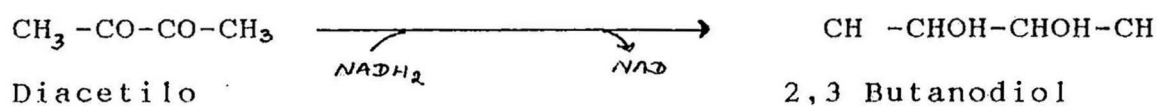
El principal producto terminal de la utilización del piruvato es el 2,3-butanodiol. Sin embargo, la reacción Voges-Proskauer se basa en la detección de la acetoina (acetilmetilcarbinol), un precursor de la producción del 2,3-butanodiol.

La acetoina puede ser metabolizada por uno de estos dos medios: 1) reducción a 2,3-butanodiol, que se acumula a menos que se produzca la reoxidación, o 2) por oxidación en diacetilo, que a su vez puede ser catabolizado. La formación de acetoina y 2,3-butanodiol es un sistema reversible de reducción o de oxidación, en el que la acetoina se convierte por reducción en 2,3-butanodiol, o éste es oxidado en acetoina. Con la exposición al oxígeno atmosférico y a un medio alcalino el 2,3-butanodiol es lentamente reversible.

Podemos interpretar esta reacción de la siguiente manera: En un medio fuertemente alcalino la acetoina y el 2,3 butilenglicol, se transforman en diacetilo, el cual con los reactivos de O'Meara, de Barrit o con solución de sulfato de cobre, dan compuestos de color rojo. Cuando esto sucede decimos que estamos frente a una reacción Voges-Proskauer positiva (36,51).

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \xrightarrow{\text{ciclo de}} 2\text{CH}_3\text{COCOOH} \xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{COCARBOXILAMINA}} \text{CH}_3\text{CO}\overset{\text{OH}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}\text{COOH}$$

E.M.      Ac. Pirúvico      *tiamina*  
*pirofosforica*



d) Prueba de utilización del Malonato

Esta prueba se funda en la utilización del malonato sódico como única fuente de carbono , con la consiguiente alcalinidad, lo cual se manifiesta por la aparición de un color azul de prusia por viraje del indicador azul de bromotimol en medio alcalino.

El medio originalmente es de color verde por contener el indicador azul de bromotimol y por tener un pH ligeramente ácido. Al virar el indicador a un color azul nos indicará que la bacteria ha utilizado el malonato (51).

e) Confirmación serológica de las colonias sospechosas.

Los subcultivos que hayan dado reacciones bioquímicas típicas de *Salmonella* se someten a pruebas serológicas confirmativas.

En esta fase, por la selección serológica de los gérmenes se puede llegar a la identificación de *Salmonella* a nivel de especie.

Se recomiendan los Antisueños *Salmonella*: Polivalente O somático y Polivalente H (flagelares).

## 2.0 P A R T E E X P E R I M E N T A L

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1. Equipos:

- Incubadora bacteriológica regulada a 35° - 0.5°C.
- Baño María regulado a 43° - 0.5°C
- Autoclave.
- Balanza analítica sensible al 0.1 g.
- Potenciómetro.
- Microscopio Estereoscópico.
- Horno.
- Destilador de agua.
- Refrigeradora.

#### 2.1.2. Material de vidrio:

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mM, 15 x 150 mM y 20x200 mM
- Placas petri de 15x100 mM
- Pipetas bacteriológicas de 1, 5 y 10 mL, graduadas al 1/10
- Frascos de vidrio neutro de capacidad 1 Lt.

- Material de vidrio para preparar medios de cultivo.

### 2.1.3. Medios de Cultivo:

#### 2.1.3.1. Medios de cultivo deshidratados del comercio:

- Caldo Selenito-Cistina (DIFCO)
- Caldo Tetracionato (DIFCO)
- Caldo Rappaport (MERCK)
- Agar Desoxicolato Citrato - DC (MERCK)
- Agar Verde Brillante - AVB -(DIFCO)
- Agar Bismuto Sulfito - ABS -(DIFCO)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato XLD-(DIFCO)
- Agar Hierro Tres Azúcares TSI - (DIFCO)
- Agar Lisina Hierro - LIA -(DIFCO)
- Caldo Triptonado - CT - (MERCK)
- Medio Malonato Fenil Alanina seg. Shaw y Clarke (MERCK)
- Caldo MR-VP seg. Voges y Proskauer (MERCK)
- Caldo Urea (MERCK)
- Caldo KCN (MERCK)



2.1.3.2. Medios de Cultivo preparados por  
ingredientes:

- Agua Peptonada Tamponada - APT  
(Medio No.1)\*
- Caldo Rappaport-Vassiliadis - RV -  
(Medio No.2)\*
- Agar de Soya y Tripticasa-TSA-  
(Medio No.3)\*

2.1.4. Soluciones Reactivos:

- Reactivo de Kovacs.
- Solución de Rojo de Metilo al 0.01%
- Solución de Hidróxido de Potasio al 40%
- Solución de Verde Brillante al 0.1%
- Solución de Yodo - Yoduro de Potasio
- Solución de Acido Clorhídrico 1/10 N
- Solución de Hidróxido de Sodio 1/10 N.
- Solución reactivo alfa naftol
- Solución acuosa de Cloruro férrico al 10%

#### 2.1.5. Otros:

- Asas y agujas de inoculación.
- Algodón
- Bolsas de polietileno de 35 x 50 cm.
- Espátulas
- Gradillas
- Cajas térmicas
- Envases con gel refrigerante
- Cuchillo
- Cocinilla eléctrica
- Mechero de gas
- Guantes
- Papel glassini
- Papel Kraft
- Papel aluminio
- Pabilo
- Agua destilada
- Plumones marcadores

\*Ver apéndice

## 2.2 Metodología Analítica

Investigaciones patrocinadas por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) y otros organismos han mostrado que no es necesario analizar cada una de las muchas muestras o unidades analíticas obtenidas de un determinado lote de alimentos. Estas múltiples unidades analíticas pueden ser combinadas o mezcladas para obtener unidades mayores para realizar las pruebas.

La técnica de análisis que se utilizó fue elaborada siguiendo las recomendaciones de la ICMSF, siguiendo los pasos que a continuación se describen.

### 2.2.1. Muestreo

Durante el período comprendido entre Agosto de 1986 y Enero de 1987 se analizaron un total de 94 muestras de verduras.

Se seleccionaron muestras de verduras por ser las que presentan mayor riesgo de contaminación al ser regadas con aguas residuales y aguas tratadas.

Las zonas de cultivo elegidas están ubicadas en los distritos de San Juan de Miraflores, San Martín de Porres y en la Provincia Constitucional del Callao. También se

realizaron algunos muestreos en los mercados de la ciudad de Lima.

Para llevar a cabo una adecuada interpretación de los resultados, las muestras fueron clasificadas de acuerdo al tipo de crecimiento: verduras que crecen a flor de tierra (VFT), verduras que crecen bajo tierra (VBT) y verduras de tallo alto (VTA). (Cuadro N° 7)

La toma de la muestra se realizó de la siguiente manera:

Utilizando guantes de plástico en ambas manos, se cogió y cortó el vegetal con el cuchillo limpio y previamente desinfectado con alcohol de 70° . Se introdujo la muestra vegetal en la bolsa de polietileno de primer uso, transportándola al laboratorio en cajas térmicas que contenían gel refrigerante.

CUADRO N° 5 CLASIFICACION BOTANICA DE LAS ESPECIES

ANALIZADAS (Agosto 1986-Febrero 19887)

FAMILIA ESPECIE	NUMERO
CRUCIFERAS	
Berros	3
Col	4
Coliflor	1
Nabo	1
Rábanos	2
UMBELIFERAS	
Culantro	2
Apio	2
Perejil	6
Zanahoria	8
COMPUESTAS	
Lechuga	5
LILIACEAS	
Cebolla	2
Cebolla China	8
Poro	4
LABIADAS	
Albahaca	2
Hierba buena	5
Orégano	2
Huacatay	7
QUENOPODIACEAS	
Acelga	4
Espinaca	5
Beterraga	4
ROSACEAS	
Fresa	8
PAPILONACEAS	
Frejol Canario	1

CUCURBITACEAS	
Caihua	1
Zapallo	1
CONVOLVULACEAS	
Camote	1
SOLANACEAS	
Ají Limeño	1
Pimiento	1
Tomate	2
Papa	1

CUADRO Nº6 PORCENTAJE DE MUESTRAS ANALIZADAS SEGUN LA CLASIFICACION BOTANICA (Agosto de 1986).

FAMILIA ESPECIE	PORCENTAJE (%)
CRUCIFERAS	11.70
UMBELIFERAS	19.16
COMPUESTAS	5.32
LILIACEAS	14.90
LABIADAS	17.03
QUENOPODIACEAS	13.84
ROSACEAS	8.51
PAPILONACEAS	1.06
CUCURBITACEAS	2.12
CONVOLVULACEAS	1.06
SOLANECEAS	5.30
TOTAL	100.00

#### 2.2.2. Preparación de la Muestra

Según las técnicas de análisis microbiológico ICMSF 1983, (27), nuestra investigación consistió en analizar 5 muestras diferentes de verduras semanalmente, ( con 5 unidades de cada muestra).

Cada muestra consistía en 5 unidades elegidas al azar, de las cuales, utilizando bolsas de polietileno de primer uso, se pesó 10 g + 0.1, teniendo así 50 g de muestra vegetal. Con la tecnología aleatoria del muestreo se trató de conseguir resultados que se aproximen a las características bióticas del alimento objeto del análisis.

#### 2.2.3. Pre-enriquecimiento o Enriquecimiento no selectivo

A los 50 g. de muestra se le adicionó en forma aséptica 450 ml ( 9 Veces el volumen ) del diluyente Agua Peptonada Tamponada <APT>.

Se agitó por 1 a 2 minutos (enjuague), y el líquido se transfirió al frasco del diluyente

Luego se procedió a marcar los frascos y se llevó a incubar a 35°C durante 18 +- 2 horas.

#### 2.2.4. Enriquecimiento Selectivo:

Después del período de incubación, 1 ml del cultivo anterior (por duplicado), fue transferido a cada uno de los tubos que contenían 10 ml de Caldo Selenito-Cistina (CS), Caldo Tetratiónato (CT) y Caldo Rappaport (CR). 0.1 ml a 10 ml de Caldo Rappapor-Vassiliadis (CRV).

Las dos series de tubos se incubaron durante 24 horas; una serie se llevó a una incubadora regulada a una temperatura de 37°C y la otra serie se llevó a un baño de agua regulado a una temperatura de 43°C.

#### 2.2.5. Aislamiento:

Se homogenizó el contenido de cada tubo y luego, con ayuda de una asa de inoculación de 5 mm de diámetro, se tomó una porción del cultivo y se sembró sobre los medios selectivos y diferenciales: Agar XLD, Agar DCA, Agar AVB y Agar ABS.

Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 24 + 3 horas y 48 horas en el caso del Agar ABS.



Luego del período de incubación, se examinaron las placas seleccionando las colonias típicas que habían desarrollado.

Agar XLD = Colonias negras o colonias rosadas con centro negro;

Agar AVB = Colonias rosadas transparentes;

Agar ABS = Colonias negras, con brillo metálico negras y verdes pequeñas.

Se empleó un microscopio estereoscópico para observar mejor las características de las colonias.

Agar XLD = Colonias redondas, lisas, transparentes algunas con centro negro.

Agar AVB = Colonias rojas transparentes, de borde irregular, aspecto cristalizado en su interior, algunas con centro negro.

Agar ADC = Colonias redondas cóncavas, lisas, transparentes como una gota de aceite con halo transparente amarillo, algunas con centro negro.

Agar ABS = Colonias redondas, transparentes, verdes cóncavas algunas con centro pardo oscuro, rugosas, como un cono cortado.

Las colonias sospechosas de cada placa se repicaron a tubos con agar TSA inclinado, que luego se incubaron a temperatura de 37°C por 24 horas.

#### 2.2.6. Pruebas Bioquímicas:

Con las cepas que desarrollan en agar TSA se sembraron los medios TSI (Agar Hierro Tres Azúcares) y LIA (Agar Lisina Hierro).

Las cepas que presentaron reacciones típicas para *Salmonella* fueron separadas para realizar con ellas las pruebas bioquímicas adicionales.

Las reacciones para *Salmonella* en TSI y LIA son:

- Glucosa = +
- Lactosa = -
- Sacarosa = -
- Gas = + (Excepto *S. typhi*)
- H<sub>2</sub>S = + (Excepto *S. paratyphi A*)
- Lisina = + (Excepto *S. paratyphi A*, y *typhimurium*)

Se realizaron las pruebas bioquímicas siguientes:

a). Producción de Indol

Medio de cultivo : Caldo triptonado.

(2 ml)

Tiempo y temperatura de incubación: 24 horas a 35-37°C.

Lectura: Adición de II-III gotas de Reactivo de Kovacs.

Un anillo rojo en la superficie del medio, indica positividad de la prueba. *Salmonella* da reacción negativa.

b). Prueba de Rojo de Metilo

Medio de cultivo: Caldo MR-VP seg. Voges Proskauer. (2 ml)

Tiempo y Temperatura de incubación: 5 día a 35-37°C.

Lectura: Adición de II-III gotas de solución de rojo de metilo. Un color rojo indica la positividad de la prueba.

*Salmonella* da reacción positiva.

c). Prueba de Voges - Proskauer

Medio de cultivo: Caldo MR-VP seg. Voges Proskauer. (2 ml)

Tiempo y temperatura de incubación: 48 horas a 35-37°C.

Lectura: Adición de solución alcohólica de alfa naftol, II gotas, seguido de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 40%, II gotas. Se agitó el tubo y se dejó en reposo durante 2-4 horas, observándose un color amarillo, que indica que *Salmonella* es negativa a esta prueba.

d). Prueba de utilización del Malonato  
Medio de cultivo: Caldo Malonato-  
fenilalanina seg. Shaw y Clarke. (2 ml)  
Tiempo y temperatura de incubación: 24-48  
horas a 35-37°C.  
Lectura: Acidular el medio con HCl 1/10 N  
hasta coloración amarilla, añadir III a IV  
gotas de solución acuosa al 10% de cloruro  
férico.  
La reacción es positiva si vira al verde.  
**Salmonella** da reacción negativa.

#### 2.2.7. Pruebas Serológicas:

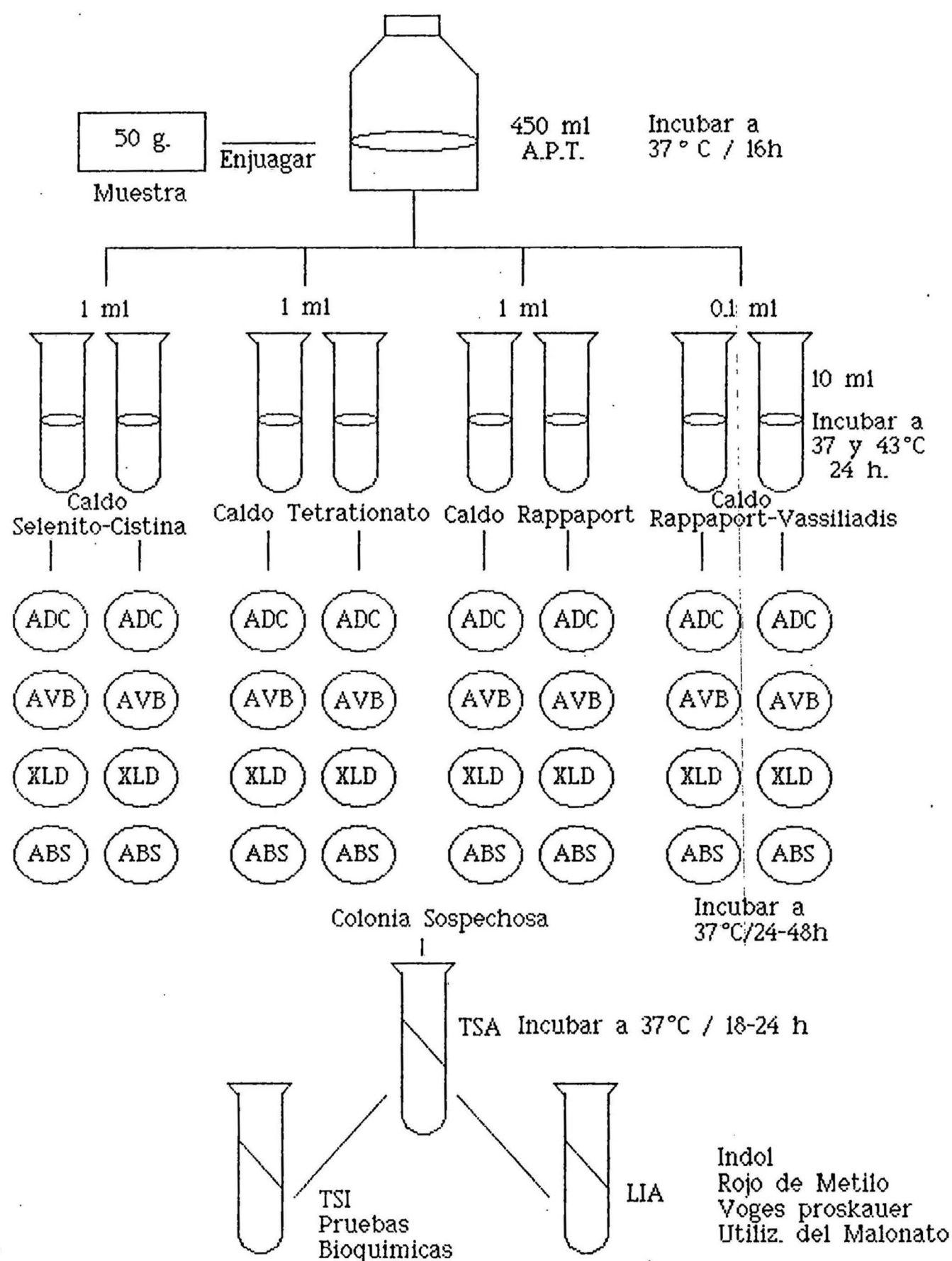
Se efectuó en el laboratorio, la confirmación de la cepas mediante pruebas serológicas utilizando anti-sueros **Salmonella** polivalente somático y pruebas de aglutinación con solución fisiológica.

Se anotaron los resultados.

Las cepas identificadas como **Salmonella**, se enviaron al Laboratorio Nacional Referencial para Enteropatógenos (LANARE) de los Institutos Nacionales de Salud, para su tipificación serológica.

# INVESTIGACION DE SALMONELLA EN VERDURAS

## ( ESQUEMA DE TRABAJO )



CUADRO N°7

AISLAMIENTO DE **SALMONELLA** DE LAS MUESTRAS DE  
VERDURAS SEGUN EL TIPO DE CRECIMIENTO  
(Agosto 1986-Enero 1987)

TIPO DE CRECIMIENTO	MUESTRAS ANALIZADAS	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS
VBT* <sup>1</sup>	24	8 (33.0%)	16
VTA* <sup>2</sup>	12	0 (0.0%)	12
VFT* <sup>3</sup>	58	3 (5.0%)	55
TOTAL	94	11 (11.7%)	83

\*<sup>1</sup>VBT : Verduras que crecen bajo tierra

\*<sup>2</sup>VTA : Verduras de tallo alto

\*<sup>3</sup>VFT : Verduras que crecen a flor de tierra

GRAFICO 7

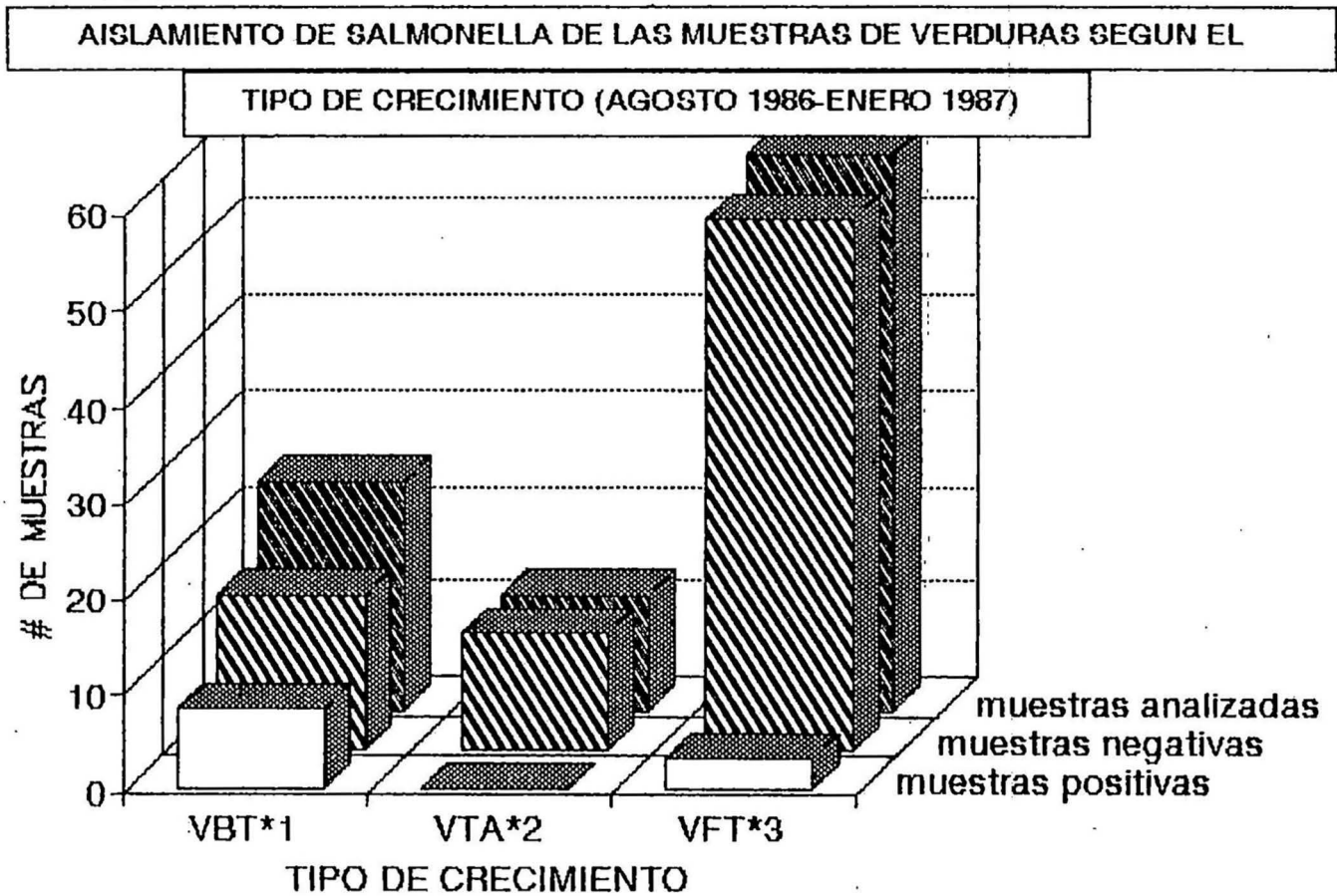
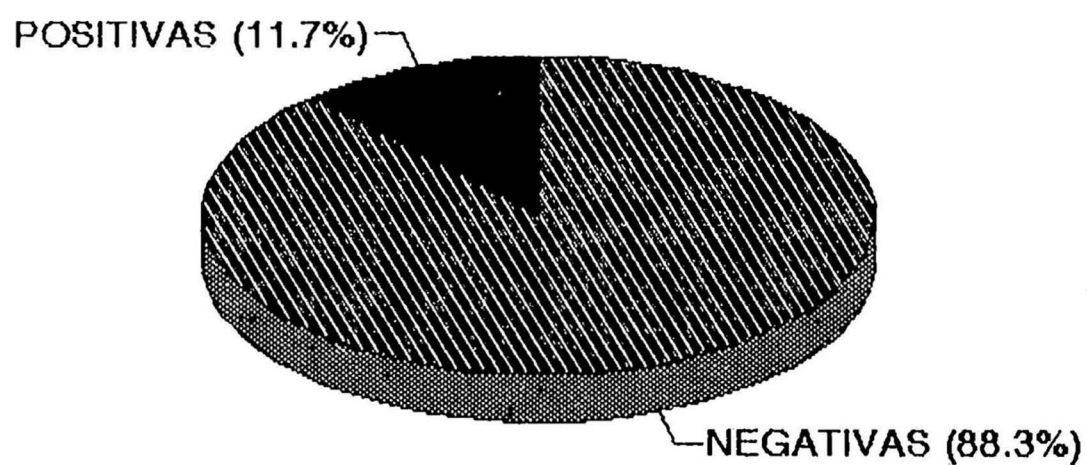


GRAFICO 7 A

AISLAMIENTO DE SALMONELLA DE LAS MUESTRAS DE VERDURAS SEGUN  
 EL TIPO DE CRECIMIENTO ( AGOSTO 1986 - ENERO 1987 )





CUADRO N°8

ASLAMIENTO DE MUESTRAS POSITIVAS A SALMONELLA EN  
LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO EVALUADOS.  
(Agosto 1986 - Enero 1987)

caldos de enriquecimiento	SC*1	T*2	R*3	RV*4	TOTAL
Muestras Positivas					
1			6		6
2				1	1
3			1		1
4			2		2
5		1		3	4
6			3	4	7
7		2		1	3
8		1			1
9			2		2
10			2		2
11				1	1
TOTAL		4	16	10	30

\*1 : Caldo de enriquecimiento selenito-cistina

\*2 : Caldo de enriquecimiento Tetracionato

\*3 : Caldo de enriquecimiento Rappaport

\*4 : Caldo de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis

GRAFICO 8

AISLAMIENTO DE MUESTRAS POSITIVAS A SALMONELLA EN LOS CALDOS

DE ENRIQUECIMIENTO EVALUADOS. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987).

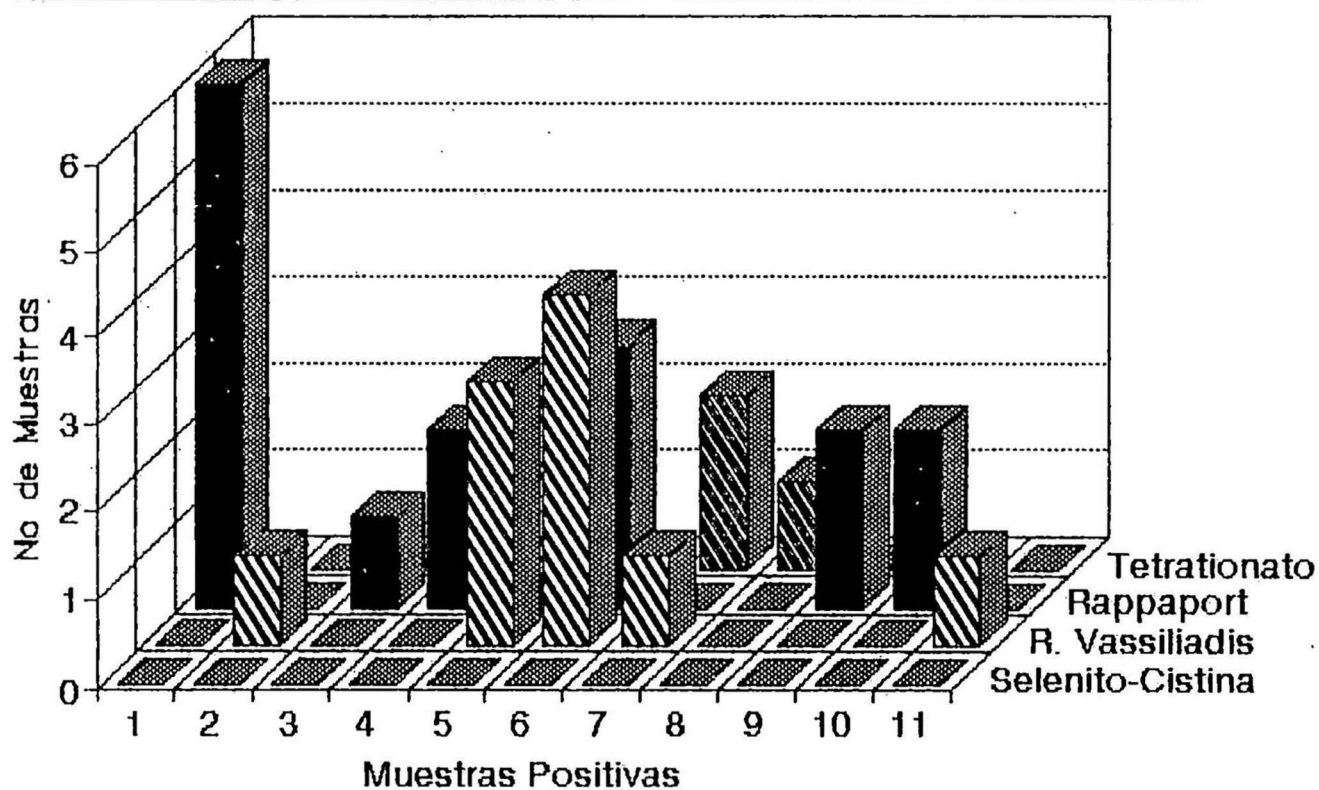
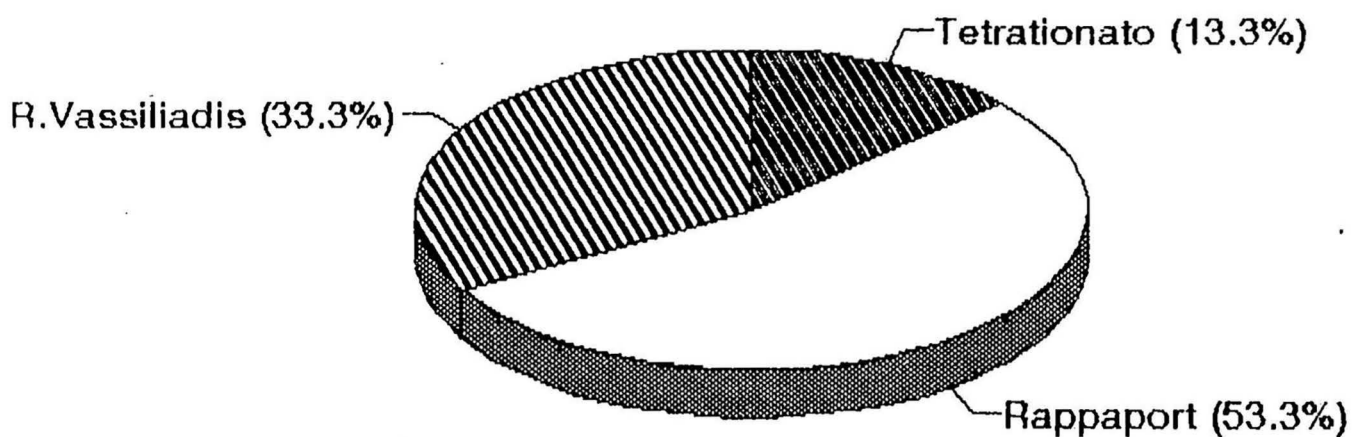


GRAFICO 8 A

ASILAMIENTO DE SALMONELLA DE LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO DE  
LAS MUESTRAS ANALIZADAS POSITIVAS (AGTO. 1986 - ENERO 1987)



CUADRO N°9

AISLAMIENTO DE **SALMONELLA** EN LOS CALDOS DE  
ENRIQUECIMIENTO SEGUN TEMPERATURAS DE INCUBACION.  
(Agosto 1986 - enero 1987)

CALDOS DE ENRIQUECI- MIENTO	SC*1	T*2	R*3	RV*4	SC	T	R	RV	TOTAL
MUESTRAS POSITIVAS	37°C				43°C				
1							6		6
2								1	1
3							1		1
4							2		2
5						1		3	4
6							3	4	7
7						2		1	3
8						1		1	1
9							2		2
10							2		2
11				1					1
TOTAL						4	16	9	30

\*1 : Caldo de enriquecimiento selenito-cistina

\*2 : Caldo de enriquecimiento Tetracionato

\*3 : Caldo de enriquecimiento Rappaport

\*4 : Caldo de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis

GRAFICO 9

AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

SEGUN TEMEPERATURAS DE INCUBACION (43°C). (Agto 1986-Enero 1987)

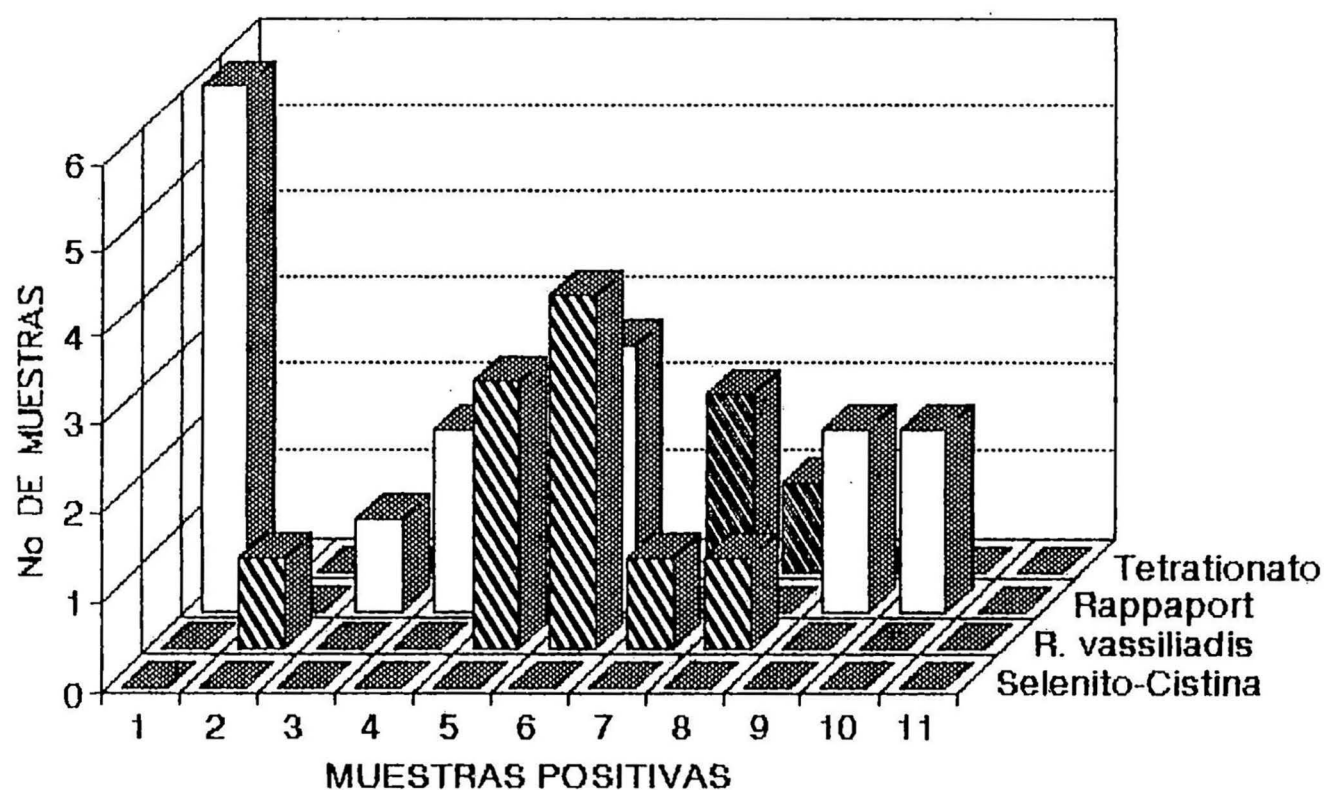


GRAFICO 9A

AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

A 37°C. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)

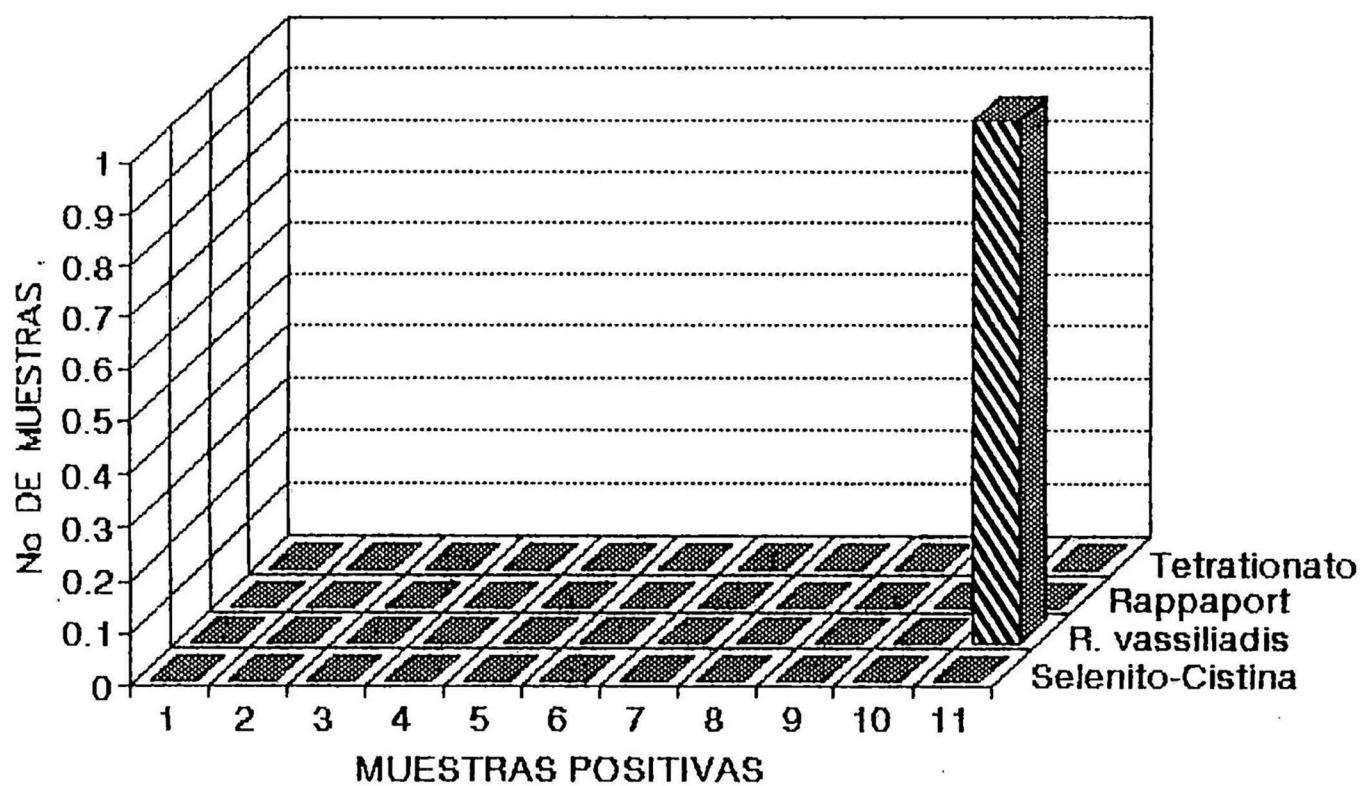
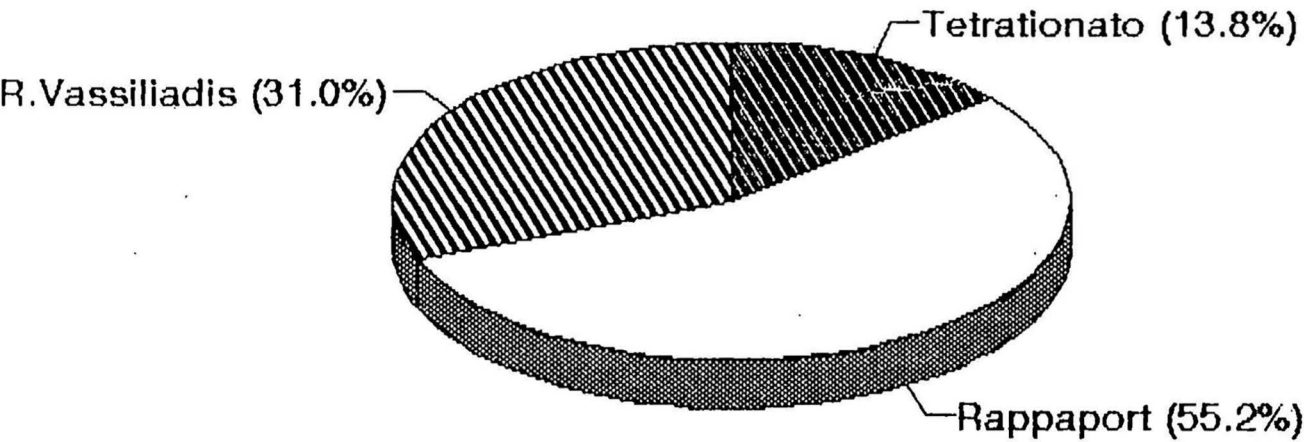


GRAFICO 9 B

AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

A 43°C. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)



CUADRO N° 10 AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE VERDURAS  
POR ZONAS DE MUESTREO.

(Agosto 1986 - Enero 1987)

PROCEDENCIA	CIENEGUILLA	SJM *1	SMP *2	CALLAO	MERCADOS	TOTAL
MUESTRAS ANALIZADAS	16	23	18	25	12	94
MUESTRAS POSITIVAS	0	2	3	6	0	11
PORCENTAJE DE POSITIVIDAD	0.0	8.70	16.66	24	0	11.70

\*1 : SAN JUAN DE MIRAFLORES

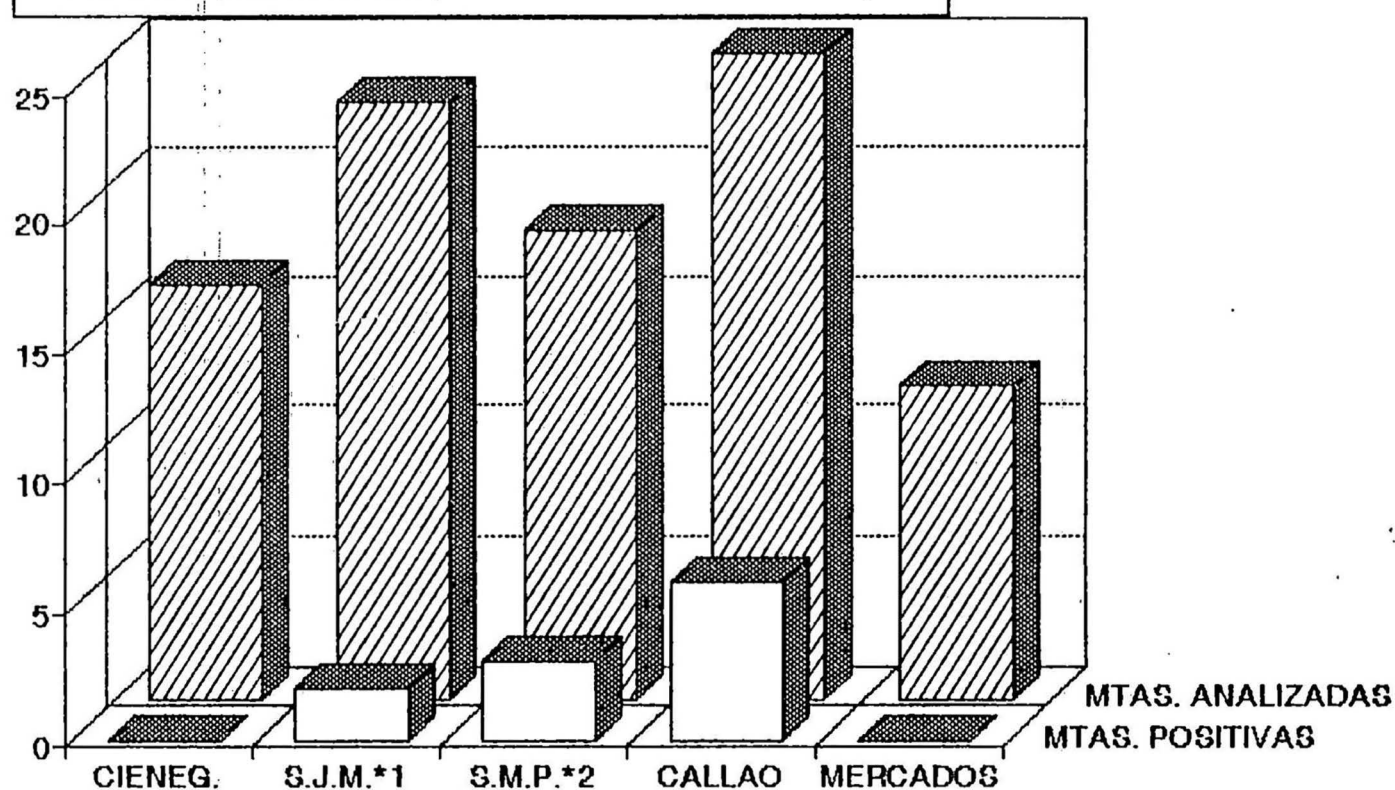
\*2 : SAN MARTIN DE PORRES



**GRAFICO 10**

**AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE VERDURAS POR**

**ZONAS DE MUESTREO. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)**



\* SAN JUAN DE MIRAFLORES

\* SAN MARTIN DE PORRES

CUADRO N° 11 AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE VERDURAS Y DIFERENTES AGARES SELECTIVOS.

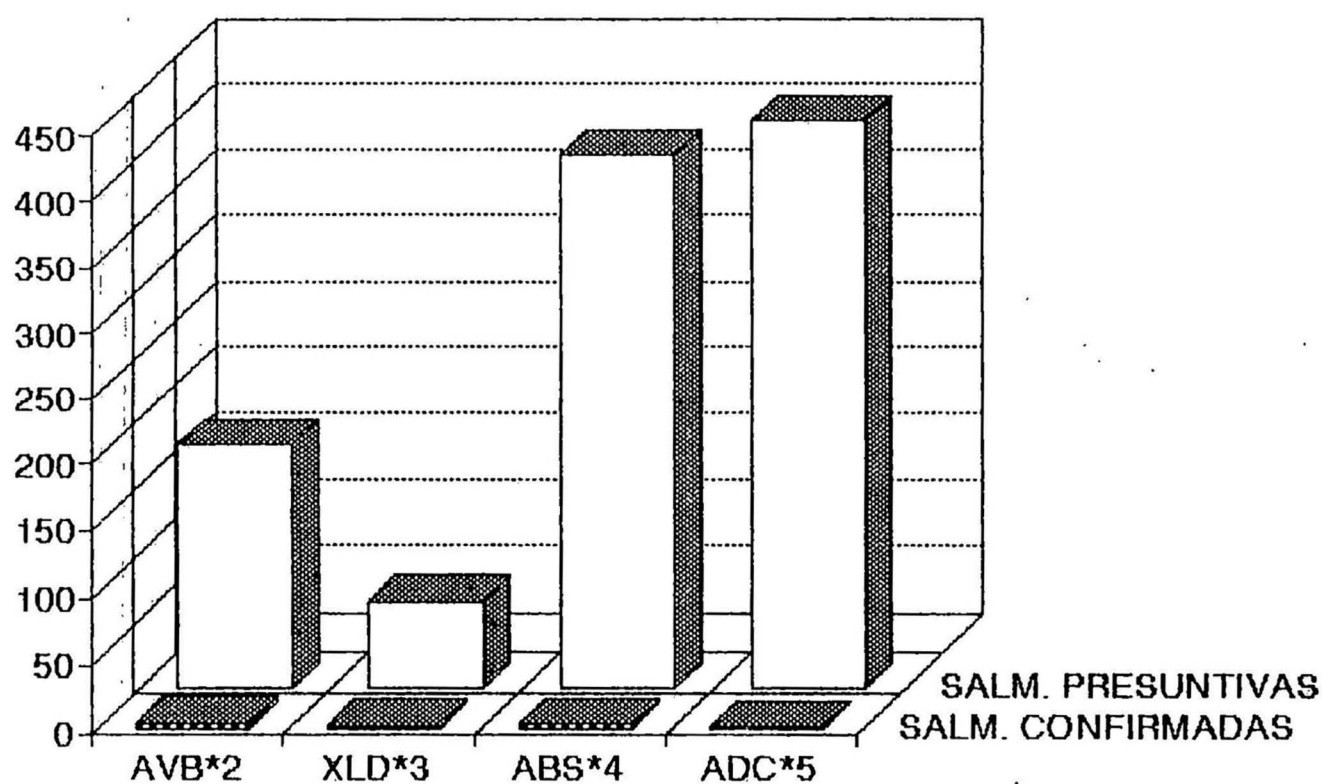
(Agosto 1986 - Enero 1987)

TIPO DE CRECIMIENTO	VBT#1				VFT #2				VTA #3			
	AVB#4	XLD#5	ABS#6	ADC#7	AVB	XLD	ABS	ADC	AVB	XLD	ABS	ADC
COLONIAS DE SALMONELLA												
SALMONELLA PRESUNTIVAS	96	33	170	185	180	63	401	428	36	12	62	72
SALMONELLA CONFIRMADAS	7	0	6	7	4	2	3	1	0	0	0	0
%POSITIVIDAD	7.77	0	3.35	3.78	2.22	3.17	7.09	0.23	0	0	0	0

- \*1 : Verduras que crecen bajo tierra.
- \*2 : Verduras que crecen a flor de tierra.
- \*3 : Verduras de tallo alto.
- \*4 : Agar verde brillante.
- \*5 : Agar Xilosa lisina desoxiolato.
- \*6 : Agar Bismuto Sulfito.
- \*7 : Agar desoxiolato-citrato

**GRAFICO 11**

**AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE VFT\*1 Y DIFERENTES AGARES  
SELECTIVOS. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)**



\*1 VERDURAS QUE CRECEN A FLOR DE TIERRA

\*2 AGAR VERDE BRILLANTE

\*3 AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO

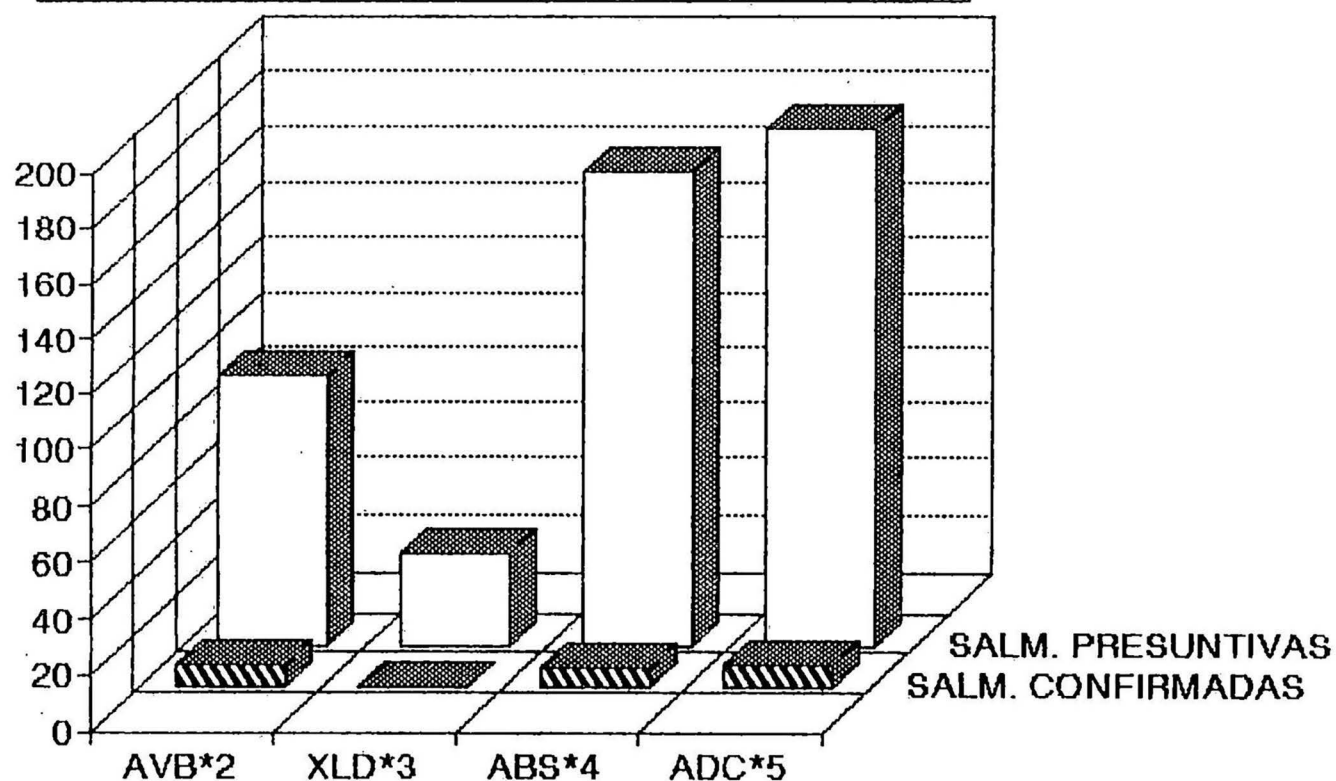
\*4 AGAR BISMUTO SULFITO

\*5 AGAR DESOXICOLATO CITRATO

GRAFICO 11 A

AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE VBT\*1 Y DIFERENTES

AGARES SELECTIVOS. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)



\*1 VERDURAS QUE CRECEN BAJO TIERRA

\*2 AGAR VERDE BRILLANTE

\*3 AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO

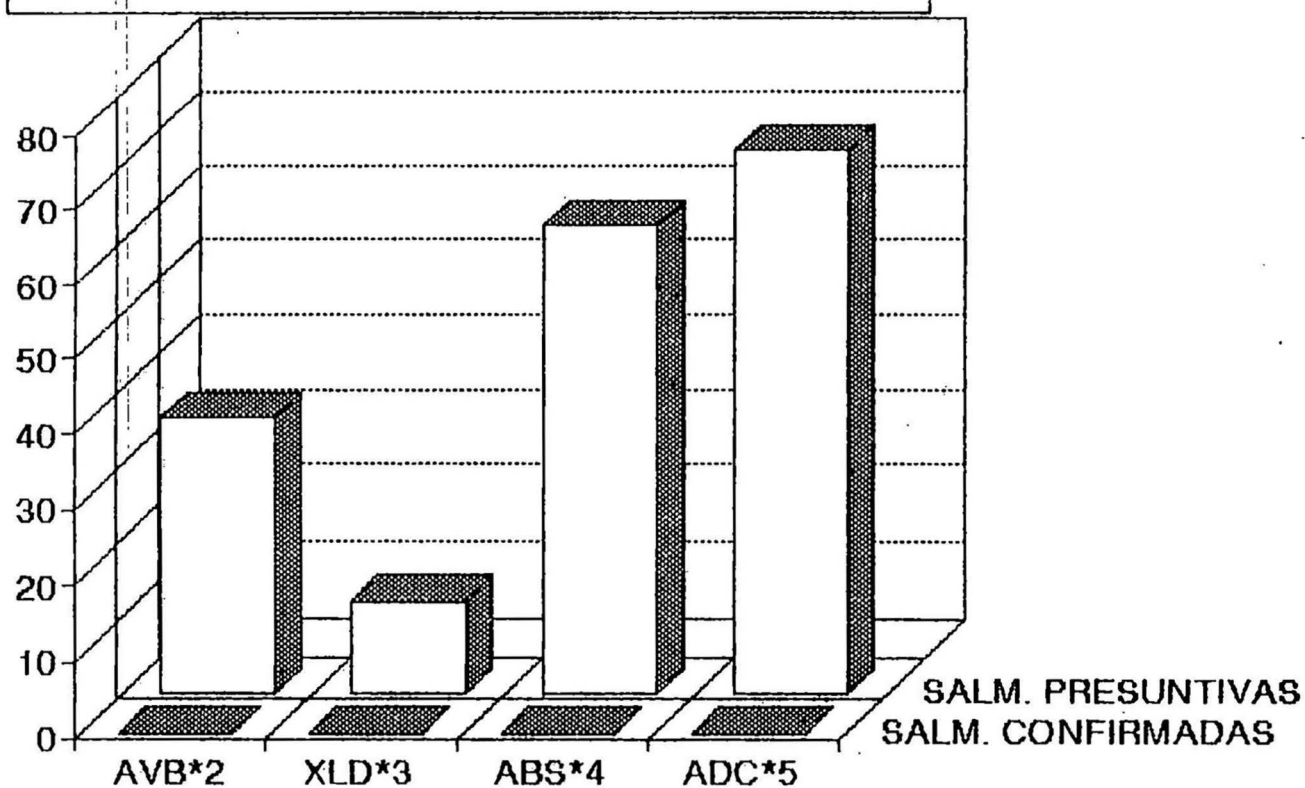
\*4 AGAR BISMUTO SULFITO

\*5 AGAR DESOXICOLATO CITRATO

**GRAFICO 11 B**

**AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE VTA\*1 Y DIFERENTES**

**AGARES SELECTIVOS. (AGOSTO 1986 - ENERO 1987)**



\*1 VERDURAS DE TALLO ALTO

\*2 AGAR VERDE BRILLANTE

\*3 AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO

\*4 AGAR BISMUTO SULFITO

\*5 AGAR DESOXICOLATO CITRATO

CUADRO N°12 AISLAMIENTO DE **SALMONELLA** A PARTIR DE CULTIVOS INCUBADOS A 43°C.

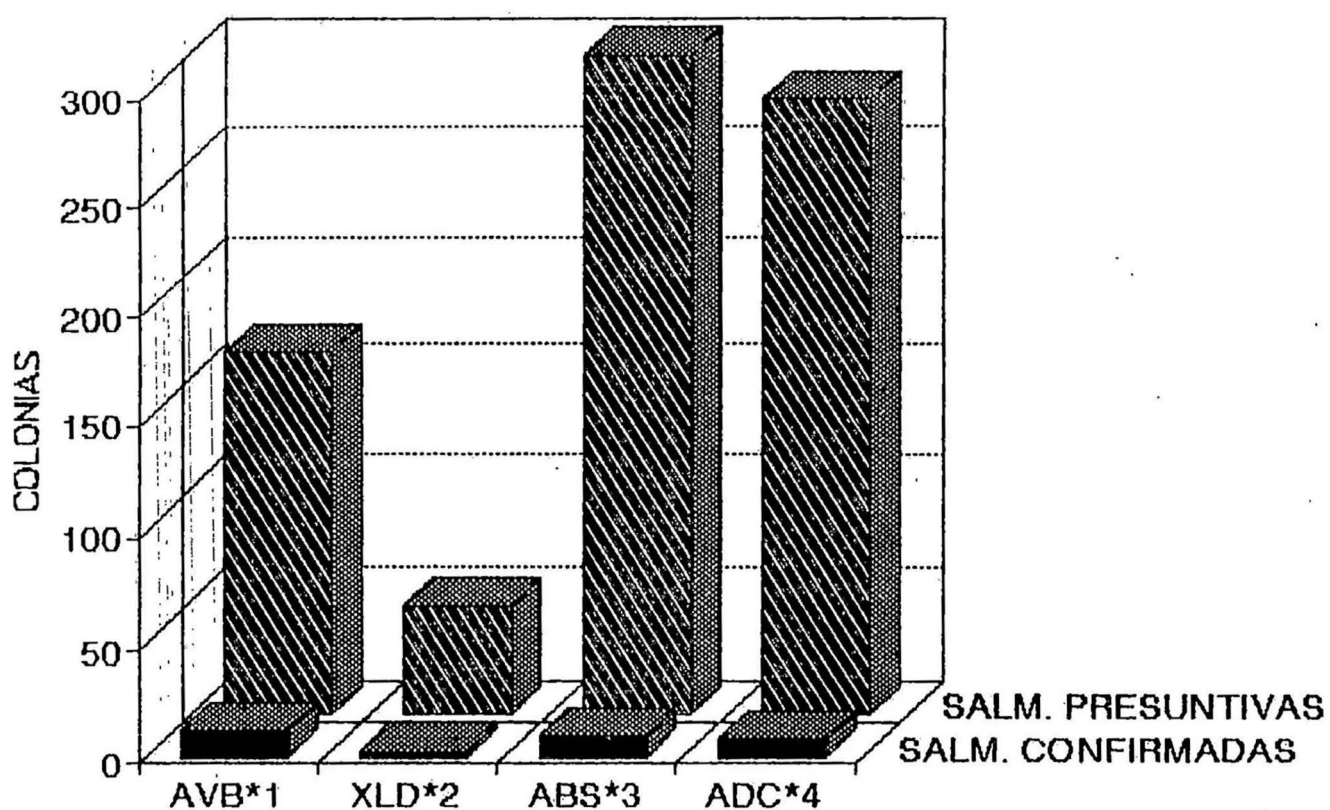
AGARES SELECTIVOS	AVB**1	XLD**2	ABS**3	ADC**4
COLONIAS DE SALMONELLA				
SALMONELLA PRESUNTIVAS	162	48	299	279
SALMONELLA CONFIRMADAS	11	2	9	8
% DE POSITIVIDAD	6.7	4.16	3.01	2.86

CUADRO N°13 DETERMINACION DE SEROTIPOS DE **SALMONELLA** ENCONTRADOS EN MUESTRAS DE VERDURAS.

SEROTIPO	TOTAL	VERDURAS
S. PARATIPHY	9	BERROS, FRESAS
S. NEWPORT	13	BETERRAGA, ZANAHORIA, CEBOLLA, ESPINACA, PORO
S. THOMPSON	2	BETERRAGA, ESPINACA
S. ORANIEMBURG	3	BETERRAGA, CEBOLLA
S. TIHYMURIUM	1	ZANAHORIA
S. AGONA	2	LECHUGA
TOTAL	30	

**GRAFICO 12**

**AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE CULTIVOS INCUBADOS A 43°C**



\*1 AGAR VERDE BRILLANTE

\*2 AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO

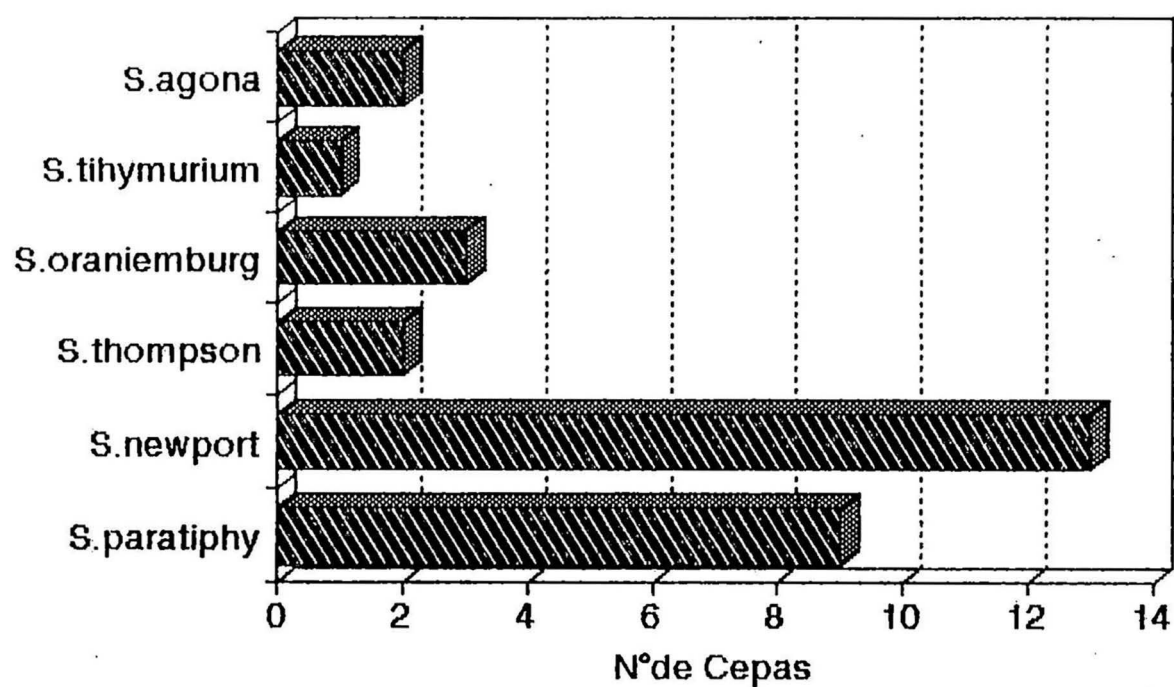
\*3 AGAR BISMUTO SULFITO

\*4 AGAR DESOXICOLATO CITRATO

GRAFICO 13

DETERMINACION DE SEROTIPOS DE SALMONELLA ENCONTRADOS

EN MUESTRAS DE VERDURAS





### 3.0 RESULTADOS

Para realizar el análisis estadístico, aplicamos la Prueba  $\chi^2$  (Chi cuadrado) de Comparación de Proporciones y la Prueba de Friedman para comparar la efectividad de los métodos o tratamientos empleados (7).

Empleamos los siguientes Caldos de enriquecimiento: Caldo Selenito-Cistina (SC), Caldo Tetraciónato (T), Caldo Rappaport (R) y Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV).

Aislamos en los siguientes Agares: Agar Verde Brillante (AVB), Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Bismuto Sulfito (ABS) y Agar Desoxicolato-citrato (ADC).

Las muestras de verduras según el tipo de crecimiento fueron:

Verduras Bajo Tierra (VBT), Verduras a flor tierra (VFT) y Verduras de tallo alto (VTA).

De igual manera, las zonas de recolección de las muestras fueron: San Martín de Porres (SMP), San Juan de Miraflores (SJM), Callao, Mercados y Cieneguilla.

Para poder comparar el total de muestras que resultaron positivas según el tipo de crecimiento, aplicamos la prueba de Chi cuadrado, obteniéndose diferencias altamente significativas a un nivel  $p < 0.01$ , siendo las verduras bajo tierra (33%) las que presentaron mayor proporción de muestras positivas que las verduras de tallo alto (0%) o verduras a flor de tierra (5%), las cuales presentaron proporciones que no difieren significativamente (Cuadro N°7).

En el Cuadro N°8 podemos observar que se compararon los números de las cepas de *Salmonella* aisladas con cada caldo de enriquecimiento para las 11 muestras que resultaron positivas, obteniéndose que las diferencias encontradas aplicando la Prueba de Friedman estadísticamente son no significativas.

Sin embargo los medios que recuperan mayor porcentaje de *Salmonella* en verduras son los caldos RAPPAPORT y RAPPAPORT-VASSILIADIS.

En el Cuadro N°9, observamos que la temperatura de 43°C es la que permite aislar mayor número de *Salmonella* que la temperatura de 37°C.

Según la zona de procedencia de las verduras, se comparó las proporciones de muestras que resultaron positivas, obteniéndose que las diferencias encontradas son significativas a un nivel  $p < 0.10$ , siendo Callao (24%) y San Martín (16.66%), las zonas de donde se obtuvieron

muestras con mayor proporción de positivas que en San Juan de Miraflores (8.7%), Cieneguilla (0%) y Mercados (0%) (Cuadro N°10)

En los Cuadros N° 11 y N° 12 se comparó la proporción de *Salmonella* confirmadas según el tipo de crecimiento del total de *Salmonella* presuntivas que se obtuvo con cada agar selectivo, obteniéndose que las diferencias encontradas son no significativas.

Al comparar la distribución de los serotipos de *Salmonella* aisladas de las muestras de verduras (Cuadro N° 13) observamos que el número mayor de serotipos aislados de *Salmonella* corresponden a *S. newport*, seguido de *S. paratyphi B*.

#### 4.0 D I S C U S I O N

La metodología y los medios de cultivo empleados inciden en el aislamiento de *Salmonella* ya que ciertos serotipos prosperan mejor en determinados medios de enriquecimiento y de selección, y ésta selectividad puede ser un fenómeno general entre las especies de este género de bacterias. Por ello, y para que las posibilidades de aislamiento fueran mayores, en el presente trabajo se utilizaron simultáneamente cuatro caldos de enriquecimiento y cuatro agares selectivos.

De los resultados obtenidos, observamos que entre las diferentes muestras de verduras VBT, VFT y VTA, existe una diferencia estadística significativa. Esto podría deberse a que las verduras que reciben la mayor carga microbiana, producto de la irrigación con aguas residuales son las VBT.

Se deduce del cuadro N° 8 que el Caldo RAPPAPORT es el que confirma mayor porcentaje de colonias de *Salmonella*, seguido del caldo RAPPAPORT-VASSILIADIS, aunque estadísticamente la diferencia es no significativa. El

empleo de los caldos RAPPAPORT y RAPPAPORT-VASSILIADIS, ofrecen las siguientes ventajas; su preparación es bastante simple y, una vez preparado, es estable por lo menos un mes. Son altamente selectivos.

El medio RAPPAPORT tiene la desventaja de que no favorece el crecimiento de *S. typhi* (48). Sin embargo, es conocido que el aislamiento de *S. typhi* a partir de alimentos no es muy común y frecuente.

Una de las razones por lo que no se aisló ninguna *Salmonella* mediante el Caldo Selenito-cistina, podría deberse a que cuando la muestra está muy contaminada no es tan efectivo (14).

Existen evidencias de que compuestos inorgánicos de Selenio pueden ejercer un efecto tóxico sobre los microorganismos (68).

En el Cuadro N° 9 se observa la gran diferencia que existe entre las temperaturas de 37°C y 43°C, para los diferentes caldos, lo cual confirma los resultados obtenidos por otros investigadores quienes recomiendan el uso de la temperatura de 43°C.

De las zonas de procedencia de las verduras, encontramos que Callao y San Martín de Porres son las que dieron mayor porcentaje de muestras contaminadas con *Salmonella* y esto confirma que estas zonas son irrigadas con aguas residuales, a diferencia de San Juan de

Miraflores que sus aguas sufren un tratamiento y Cieneguilla, irrigadas por un río menos contaminado.

El Agar AVB constituyó el medio de cultivo de mayor eficiencia dentro del esquema de aislamiento e identificación de *Salmonella* para muestras de verduras. Esto se debe a que es un medio altamente selectivo y diferencial.

El serotipo de *Salmonella* aislado con mayor frecuencia de las verduras fue *S. newport*, seguido de *S. paratyphi* B.

## 5.0 C O N C L U S I O N E S

- 1) La clave para el buen éxito en la recuperación de *Salmonella* en verduras es el desarrollo de un medio apropiado que estimule el crecimiento de patógenos mientras inhibe el crecimiento de organismos comunes a la epidermis de la planta, tierra y agua contaminada (18).
- 2) En el aislamiento de *Salmonella* a partir de los cuatro medios de cultivo, el medio de RAPPAPORT resultó ser el más eficaz, sensible y de mejor recuperación.
- 3) Los medios RAPPAPORT y RAPPAPORT-VASSILIADIS son más económicos, fáciles de preparar y notablemente uniformes entre muchos. Pueden ser esterilizados en recipientes tapados, en volúmenes de 500 ml y distribuidos en cantidades pequeñas en tubos de prueba cuando se necesiten (P. VASSILIADIS, PAPADAKIS, KARALIS, 1976 (38,45,48,65,66)).
- 4) La recuperación de *Salmonella* a partir de los caldos de enriquecimiento empleados se presentó en el orden siguiente: Caldo RAPPAPORT (17.02%), Caldo RAPPAPORT-

VASSILIADIS (10.63%), Caldo TETRATIONATO (1.06%) y Caldo SELENITO-CISTINA (0%).

5) La mayor recuperación de *Salmonella* se obtuvo a la temperatura de 43°C.

6) Las verduras bajo tierra (VBT) son las que reciben mayor carga microbiana, por lo tanto, se obtuvo mayor número de muestras positivas.

7) La detección de *Salmonella* a partir del caldo RAPPAPORT, RAPPAPORT-VASSILIADIS y TETRATIONATO fué mayor cuando el aislamiento se realizó en el AGAR VERDE BRILLANTE modificado.

8) Los serotipos aislados en orden de frecuencia fueron: *S. newport*, *S. paratyphi B*, *S. oranienburg*, *S. agona*, *S. thompson* y *S. typhimurium*.

9) Se hizo una comparación de los costos de los caldos de enriquecimiento utilizados, por litro, de acuerdo a los precios actuales del mercado y fueron:

- Caldo Selenito	x 1 lb.	(US.\$ 115.64)
- Caldo Tetracionato	x 500 g.	(US.\$ 105.31)
- Caldo Rappaport	x 500 g.	(US.\$ 92.73)
- Caldo Rappaport-Vassiliadis	x 500 g.	(US.\$ 97.92)

Teniendo en cuenta estos datos concluimos que los caldos Rappaport y Rappaport-Vassiliadis cuestan algo menos que los otros caldos y son más eficaces en la recuperación de *Salmonella*.



## 6.0 RECOMENDACIONES

- 1).- Seleccionar adecuadamente las muestras de verduras tomando en cuenta el tipo de crecimiento, ya que éste influye en los probables niveles de contaminación, antes de efectuar los análisis.
- 2) Para muestras de verduras, se recomienda el empleo de marchas analíticas utilizando para el enriquecimiento los caldos RAPPAPORT y RAPPAPORT-VASSILIADIS. Estos medios pueden combinarse con el Agar Verde Brillante modificado que, para efectos del presente trabajo es el que ha permitido la mejor recuperación de *Salmonella*.
- 3) Se recomienda el empleo de la temperatura de incubación a 43°C para los caldos de enriquecimiento anteriormente mencionados.
- 4) Tradicionalmente se viene utilizando los caldos de enriquecimiento Selenito y Tetracionato, pero por los resultados obtenidos no los recomendamos para el aislamiento de *Salmonella* a partir de muestras de verduras.

5).- Complementariamente, se recomienda realizar un control bacteriológico de las aguas de irrigación ya que el mayor número de muestras de verduras contaminadas con *Salmonella* provino de las zonas de Callao y San Martín de Porres, que son irrigadas con aguas residuales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 01) ALCAIDE, E. & Col. 1982 Improved *Salmonella* recovery from moderate to highly polluted waters. Journal of Applied Bacteriology 53,143-146.
- 02) ANDREWS, W. H. & Col. 1983 Improved *Salmonella* Species Recovery from Nonfat Dry Milk Pre-enriched Under Reduced Rehydration. Journal of Food Science 48,1162-1165.
- 03) BAILEY, J.S., & Col. 1981 Efficiency of Selenite Cystine and TT Enrichment Broths for the Detection of *Salmonella*. Journal of Applied Bacteriology 51, 409-414.
- 04) BERGEY's 1984 Manual of Systematic Bacteriology.
- 05) CARRINGTON, E. G. 1980 The isolation and Identification of *Salmonella* spp. in sewage sludges: A comparison of methods and Recommendation for a standard technique. Water Research Centre, Technical Report, TR 129, 14-25.

- 06) CHERRY, W.B., & Col. 1972 *Salmonellae* as an Index of Pollution of Surface waters. Applied Microbiology 24, N°3, 334-340.
- 07) CONOVER, W.J. 1980 Practical Nonparametric statistics. Edit. John Wiley and Sons. 2th. edition.
- 08) CORTES J.E., ROMERO F., Caracterización microbiológica de aguas residuales crudas con fines agrícolas. Secretaria de Agricultura y recursos hidráulicos Comisión Nacional del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Coordinación de Investigación. Subcoordinación de Calidad del Agua.
- 09) CORRY AND JANET 1972 Quality assurance and quality control of Microbiological Culture Media. Journal of Applied Bacteriology 48, 501, 504.
- 10) CORTINEZ, Y. de, y GUZMAN, A. de, . 1987 Investigación de *Salmonella* en cabritos faenados. Boletín Of. Sanit. Panam., 103 (4), 373-377.
- 11) DAGUET, G.L., y col. 1977 Exámenes de Laboratorio. Técnicas en Bacteriología I. Aerobios. editorial Jims, Barcelona, España.
- 12) D'AOUST J.Y., STOTLAND P., AND BOVILLE A. 1982 Sampling methods for detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. Journal of food Science, (47), 1643-1644.

- 13) EDGAR, D. & SOAR, M.S. 1979 Evaluation of Culture Media for the Isolation of *Salmonella* from Sewage Sludge. *Journal of Applied Bacteriology* 47, 237-241.
- 14) ENTIS, P. & Col. 1982 Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Food by Use of the ISO-GRID Hydrophobic Grid Membrane Filter. *Applied and Environmental Microbiology*. 261-268.
- 15) FEACHEN, R. and Col. 1983 Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. Edit. World Bank-Wiley. New York, U.S.A.
- 16) FERNANDEZ, E. y Col. 1983 Incidencia de *Salmonella* en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. *Rev. Lat. Microbiología*. 25, 263-269.
- 17) GALLO, G.E., 1985 Aislamiento de *Salmonella* de los terrenos aledaños a Las Lagunas de San Juan. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología.
- 18) GELDREICH, E. and BORDNER, R. 1971 Fecal Contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. *Journal of Milk and Food technology*, 34, 184-195.

- 19) GUNTHER, 1981 Microbiología de los alimentos vegetales. Ed. Acribia, Zaragoza- España.
- 20) HARVEY, R.W.S. and PRICE, T.H., 1968 Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of *Salmonella* from heavily contaminated materials. Journal of Hygiene Camb., 66; 377-381.
- 21) HARVEY, R.W.S. and PRICE, T.H., 1975 Studies on the isolation of *Salmonella dublin*. Journal of Hygiene Camb., 74, 369-375.
- 22) HARVEY, R.W.S. and PRICE, T.H., 1976 Isolation of *Salmonella* from sewage-polluted river water using Selenite F and Müller-Kauffmann tetrathionate. Journal of Hygiene Camb., 77; 333-339. 1976.
- 23) HARVEY, R.W.S. and PRICE, T.H., 1977 Observations on Pre-enrichment for Isolating *Salmonella* from Sewage Polluted Natural Water Using Muller-Kauffmann Tetrathionate Broth Prepared with Fresh and Desiccated Ox Bile. Journal of Applied Bacteriology 43, 145-148.
- 24) HARVEY, R.W.S. and PRICE, T.H., 1976 Principles of *Salmonella* isolation: A review. Journal of Applied Bacteriology, 46; 27-56.

- 25) HUARINGA, L., 1985 Inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en la Determinación de *Salmonellae*. Tesis para optar el título profesional de Químico-Farmacéutico.
- 26) HUSSONG, D. and Col. 1985 Occurrence, Growth and Suppression of *Salmonellae* in composted sewage sludge. *Applied and Environmental microbiology*, 50, N° 4 887-893.
- 27) I.C.M..S.F. International Commission on Microbiological specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos I. Técnicas de Análisis microbiológico. Editorial Acribia. 2° Ed. Zaragoza- España.
- 28) I.C.M.S.F. 1980 International Commission on Microbiological specifications for Foods. Ecología Microbiana de los Alimentos 1, Vol. I. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Ed. Acribia- Zaragoza- España.
- 29) I.C.M.S.F. 1985 International Commission on Microbiological specifications for Foods. Ecología Microbiana de los Alimentos 2, Vol II. Productos alimenticios.
- 30) JAY M. James, 1973 Microbiología Moderna de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza- España.
- 31) JONES, F. and WATKINS, J., 1985 The water cycle as a

- source of pathogens. Journal of Applied Bacteriology Symposium suplement 27S- 36S.
- 32) KAFEL, S. and BRYAN, F.L., 1977 Effects of Enrichment Media and Incubation conditions on isolating *Salmonellae* from Ground- meat filtrate. Applied and Environmental Microbiology Vol. 34, 285-291. U.S.A.
- 33) KOWAL.N.E., 1983 Health aspects of wastewater reuse in agricultural. National Research Council. Washington D.C. Nat. Acad. Press. 30-52.
- 34) KRUGMAN, S. y KATZ, S., 1984 Enfermedades infecciosas. Nueva Editorial Interamericana. S.A. México,D.F.
- 35) LÜCK, E. 1981 Conservación Química de los Alimentos. Ed. Acribia Zaragoza - España p.70.
- 36) MAC FADDIN, J., 1980 Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica.Editorial Médica Panamericana. S.A.
- 37) MANAFI, M. and SOMMER, R., 1992 Comparison of three rapid screening methods for *Salmonella* spp. MUCAP Test, Micro-Screen r Latex and Rambach Agar. Letters in Applied Microbiology 14,163-166.
- 38) MATCHES, J.R. and LISTON,J., 1968 Low Temperature Growth of *Salmonella*. Journal of Food Science. Vol. 33 641-645.



- 39) MENDOZA, S., 1987 Actualización en Microbiología de Alimentos. Asociación Peruana de Microbiología. Congreso Latinoamericano de Microbiología. Curso Pre-Congreso 8 -12 Junio Lima-Perú.
- 40) MERCK, Manual de medios de cultivo 1990.
- 41) MOATS, W.A. and KINNER J.A., 1974 Factors Affecting Selectivity of Brilliant Green-Phenol Red Agar for *Salmonellae*. Applied Microbiological. Vol 27, N° 1, 118-123.
- 42) MOSSEL, D.A., MORENO G.B., Microbiología de los alimentos. 1ra. Edición española. Ed. Acribia S.A. Zaragoza- España.
- 43) OMS. 1981 Health aspects of treated sewage reuse. OMS/EURO. Copenhagen.
- 44) PADRON G., PEREZ R. y col., 1986 Utilización del Ozono como agente desinfectante de aguas contaminadas con *Salmonella*. Rev. Cubana Hyig. Epid. 24 (4): 435-438.
- 45) PASCUAL ANDERSON M. 1989 Microbiología Alimentaria: Detección de Bacterias con significado Higiénico-Sanitario. AGISA: Madrid - España., 89 - 138.
- 46) RAMBACH, A., 1990 New Plate Medium for Facilitated-

Differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and Other Enteric Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Vol 56, 301-303.

- 47) RENGEL, A., MENDOZA, S., 1984 Isolation of *Salmonella* from Raw Chicken in Venezuela. Journal of Food Protection. Vol. 47, N°3, 213-216.
- 48) RODRIGUEZ D., GONZALES I. y otros., 1985 Estudio de la presencia y comportamiento de *Salmonella* en el río Luyano. Rev. Cub. Hig. Epid. 23: 343-362.
- 49) RUSS, C.F. and YANKO W.A., 1981 Factors affecting *Salmonellae* repopulation in composted sludges. Appl. Environmental Microbiology., 41 (3): 597-602.
- 50) SAIZ-MORENO, L. 1982 Higiene de la Alimentación. Aspectos Bióticos y Epidemiológicos, repercusiones sanitarias y económicas. 1ra. Ed. Editorial AEDOS- Barcelona-España.
- 51) SALCEDO, D. y CRISPIN, V. 1987 Medios de cultivo. Interpretación Bioquímica. U.N.M.S.M. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- 52) SCHMIDT-HEBBEL, H., 1981 Avances en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Alfabet Impresores- Santiago.
- 53) SMELTZER T.I., and DUNCALFE, F. 1979 Secondary

selective enrichment of *Salmonella* from Naturally contaminated specimens by using a selective Motility sistem. Applied and Enviromental Microbiology, Vol. 37, N°4, 725-728.

54) STEWART B.J., EYLES, M.J., MURRELL, W.G. 1980 Rapid radiometric method for detection of *Salmonella* in foods. Applied and Enviromental Microbiology. Vol 40, N°2, 223-230.

55) SUGIYAMA, H. DACK, and col. 1960 Agglutinating antiserum for the isolation of *Salmonella* with special reference to isolation from Egg. Albumin. Applied Microbiology, Vol 8.

56) SVEUM, W.H., KRAFT, 1981 Recovery of *Salmonellae* from Foods using a Combined Enrichment Technique. Journal of Food Science, Vol. 46, 94-99.

57) THAYER, D.W. and col., 1987 Effect of NaCl, pH, Temperature, and Atmosfhere on Growth of *Salmonella typhimurium* in Glucose- Mineral Salts Medium. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, N°6, 1311-1315.

58) TRICHOPOULOS, D., PAPADAKIS, J.A., KARALIS, D., and VASSILIADIS, P. 1975 Incubation at raised temperature of enrichment media, combined with secondary enrichment in Rappaport's medium, for

- the isolation of *Salmonella* from sewage. Journal Hyg. Camb. Vol. 74, 205-213.
- 59) TUNCAN, E., and MARTIN, S. 1985 Effect of pH, Temperature, and Potassium Sorbate on Amino Acid Uptake in *Salmonella typhimurium* 7136. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 49, N° 3, 505-508.
- 60) VASSILIADIS, P., PATERAKI, E., PAPADAKIS, J. and TRICHOPOULOS, D. 1974 Evaluation of the Growth of *Salmonellae* in Rappaport's Broth and in Muller-Kauffmann's Tetrathionate Broth. Journal Applied Bacteriology. Vol. 37, 411-418.
- 61) VASSILIADIS, P., PAPADAKIS, J. A., KARALIS, D. and TRICHOPOULOS, D. 1976 Enrichment in Muller-Kauffmann's Broth and Rappaport's Broth from Boffered Peptone Water in the Isolation of *Salmonellae* from Minced Meat. Journal Applied Bacteriology. Vol. 40, 349-354.
- 62) VASSILIADIS, P., TRICHOPOULOS, D., KALANDIDI, A., and XIROUCHAKI, E., 1978 Isolation of *Salmonellae* from Sewage with a New Procedure of Enrichment. Journal of Applied Bacteriology. Vol 44, 233-239.

- 63) VASSILIADIS,P., TRICHOPOULOS,D., PAPOUTSAKIS and  
PALLANDIOU,E., 1979 A Note on the Comparison of  
two Modifications of Rappaport's Medium with  
Selenite Broth in the Isolation of *Salmonella*.  
Journal of Applied Bacteriology . Vol. 46, 567-  
569.
- 64) VASSILIADIS, P., KALAPOTHAKI,V., TRICHOPOULOS,D.,  
MAVROMMATTI,CH. and SERIE,CH., 1981 Improved  
Isolation of *Salmonellae* from Naturally  
Contaminated Meat Products by Using Rappaport-  
Vassiliadis Enrichment Broth. Applied and  
Environmental Microbiology, Vol. 42, 615-618.
- 65) VASSILIADIS,P. 1983 The Rappaport-Vassiliadis (RV)  
enrichment medium for the isolation of  
*Salmonella*: An overview. Journal of Applied  
Bacteriology. Vol. 54, 69-76.
- 66) VASSILIADIS,P. and col., 1984 A comparison of the  
original Rappaport medium (R medium) and the  
Rappaport-Vassiliadis medium (RV medium) in the  
isolation of *Salmonellae* from meat products.  
Journal of Hygiene. Vol. 93, 51-58.
- 67) WATSON,D.C., 1980 The survival of *Salmonellae* in  
sewage applied to arable land. Wat. Pollut.  
Cont. 79 (1):11-18.
- 68) WEISS,K.F. and col. 1965 Inhibitory Action of

Selenite on *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*,  
and *Salmonella thompson*. Journal of  
Bacteriology. Vol. 90, N° 4, 857-862.

- 69) YANES, F., 1982 Manual de Métodos experimentales  
"Evaluación de Lagunas de Estabilización".  
Serie Técnica 24 CEPIS, OPS/OMS. Lima. 84-90.

## APÉNDICE

### FORMULAS Y PREPARACIONES DE MEDIOS DE CULTIVO

#### MEDIO Nº 1: Agua Peptonada Buferada (A.P.B.)

##### Composición:

Peptona de carne.....	10.0 g.
Sodio Cloruro.....	5.0 g.
Di-Sodio hidrogenofosfato.....	9.0 g.
Potasio dihidrogenofosfato.....	1.5 g.

##### Preparación:

Disolver los ingredientes en un Litro de Agua Destilada, distribuir en cantidades adecuadas y esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121°C (15 libras de presión).

La reacción final del medio será de un pH 7.2 + 0.1

## MEDIO Nº 2: Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV)

### Composición:

#### Solución A:

Peptona de caseína.....5.0 g.  
Sodio Cloruro.....8.0 g.  
Potasio dihidrogenofosfato.....1.6 g.  
Agua destilada.....1000.0 mL

#### Solución B:

Magnesio Cloruro. 6H O.....400.0 g.  
Agua destilada .....1000.0 mL

#### Solución C:

Verde de malaquita oxalato .....0.4 g.  
Agua destilada.....100.0 mL

### Preparación:

Preparar las tres soluciones por disolución completa de sus ingredientes. La solución A debe ser preparada al mismo día de su uso, las soluciones B y C pueden ser guardadas en un frasco oscuro a temperatura del ambiente hasta por 1 año y 6 meses, respectivamente.

El medio completo se prepara mezclando 1000.0 mL de solución A , 100.0 mL de solución B y 10.0 mL de solución C, dando un volumen final de 1110.0 mL. Distribuir en tubos en porciones de 10 mL y esterilizar en el autoclave a 115°C durante 15 minutos.



La reacción final del medio debe ser de un pH 5.0.

### MEDIO Nº 3    Agar Soya Trypticasa (TSA)

#### Composición:

Trypticasa (peptona de caseína obtenida por digestión pancreática).....	15.0 g.
Peptona de Soya.....	5.0 g.
Sodio cloruro .....	5.0 g.
Agar-agar.....	15.0 g.
Agua destilada .....	1000.0 mL.

#### Preparación:

Disolver los ingredientes en 1000.0 mL de agua destilada, mezclar bien. Se calienta con agitación fuerte y se hierve durante 1 minuto. Luego de la disolución se enfría a 45°C y se controla el pH a 7.2 . Repartir en tubos de prueba y autoclavar a 115°C por 15 minutos. Al momento de salir del autoclave, estando aún tibios, se inclinan los tubos.